

---

# **Rezeptorlipide zur Assemblierung von basischen und Arginin-getaggten Proteinen auf Oberflächen**

## **Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. -

vorgelegt von

**Marc Blecking**

geboren in Dinslaken

Fakultät für Chemie, Institut für Organische Chemie

der

Universität Duisburg-Essen

**2010**

---

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Oktober 2006 bis März 2010 im Arbeitskreis von Prof. Dr. Thomas Schrader am Institut für Organische Chemie der Universität Duisburg-Essen angefertigt.

Diese Arbeit wurde am 26. April 2010 eingereicht und am 05. Mai 2010 von der Fakultät für Chemie der Universität Duisburg-Essen als Dissertation angenommen.

Tag der Disputation: 07. Juni 2010

Erstgutachter:	Prof. Dr. Thomas Schrader
Zweitgutachter:	Prof. Dr. Gebhard Haberhauer
Prüfungsvorsitzender:	Prof. Dr. Christian Mayer



---

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel

**„Rezeptorlipide zur Assemblierung von basischen und  
Arginin-getaggten Proteinen auf Oberflächen“**

selbst verfasst und keine außer den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen benutzt habe, und dass die Arbeit in dieser oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Universität eingereicht wurde.

Essen, im April 2010

Marc Blecking

---

Teile dieser Arbeit sind publiziert, eingereicht oder auf Kongressen präsentiert worden:

Nanobionics 4 - From Molecules to Applications, Marburg, 17.09.2007 – 21.09.2007.

Supracat Konferenz, Barcelona, Spanien: 02.03.2008 - 05.03.2008.

---

## Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Thomas Schrader für die Möglichkeit, ein so interessantes Thema bearbeiten zu können.

Prof. Dr. Gebhard Haberhauer danke ich für die Übernahme des Koreferats und Prof. Dr. Christian Mayer für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Für die Einführung in die RfS-Technologie, die Vesikelpräparation, und die zur Verfügungstellung von Arginin- und Histidin-getaggttem MBP bedanke ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Jacob Piehler und seinem Arbeitskreis. Für die zur Verfügungstellung von ungetaggttem und Arginin-getaggttem Bakteriorhodopsin bedanke ich mich bei Björn Heidel und Prof. Dr. Norbert Hampp.

Für die finanzielle Unterstützung bedanke ich mich bei der WASAG-Stiftung für Studiensförderung für die Gewährung eines Stipendiums und der Werdelmann-Stiftung für die Zuwendung durch Sachmittel.

Heinz Bandmann und Dr. Torsten Schaller danke ich für die Aufnahme der NMR-Spektren und für die stetige Diskussionsbereitschaft. Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Torsten Schaller für die viele Zeit und Ausdauer, die er für das Molekül-Modelling aufgebracht hat. Auch Viktor Heinrichs ist für die Modelling Bilder herzlich gedankt. Werner Karow danke ich für die Anfertigung der Massenspektren.

Ich danke Klaus Kowski für die freundliche Unterstützung bei der Lösung von verschiedensten (technischen) Problemen und Heike Wöll für die Filmwaagemessungen und die Synthese von Peptiden.

Allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern des Arbeitskreises Schrader, sowie auch des Arbeitskreises Haberhauer danke ich für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre, die Diskussionsbereitschaft und die Unterstützung jeglicher Art. Mein besonderer Dank gilt hierbei Dr. Jolanta Polkowska, Kirstin Wenck, Kai Bernitzki, Constanze Wilch, Dr. Katrin Hochdörffer und Dr. Sun Wei und für die freundschaftliche Zusammenarbeit und die Hilfe bei Problemen jeglicher Art. Sie hatten für alle Sorgen und Probleme stets ein offenes Ohr.

Schließlich möchte ich mich noch ganz besonders herzlich bei meiner Ehefrau Caroline bedanken, die mich immer tatkräftig und liebevoll bei allen Problemen und Zweifeln unterstützt hat und mir während der ganzen Zeit immer wieder Kraft gegeben und neuen Mut gemacht hat. Ohne Ihre Hilfe und Unterstützung wäre ich nicht da, wo ich jetzt stehe.

---

---

*Für Caroline*

---

---

<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>- 1 -</b>
<b>1.1. Molekulare Assemblierung von Proteinen auf Oberflächen .....</b>	<b>- 1 -</b>
<b>1.2. Optische (Bio)Sensoren für die Analyse von bimolekularen Wechselwirkungen (BIA) .....</b>	<b>- 12 -</b>
<b>1.3. Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIfS).....</b>	<b>- 18 -</b>
<b>1.4. Künstliche (Bio)Membranen – Lipiddoppelschichten (SLB) – auf Oberflächen durch Vesikelfusion .....</b>	<b>- 22 -</b>
<b>2. AUFGABENSTELLUNG .....</b>	<b>- 26 -</b>
<b>3. DURCHFÜHRUNG UND ERGEBNISSE.....</b>	<b>- 34 -</b>
<b>3.1. Synthesen .....</b>	<b>- 34 -</b>
3.1.1. Synthese des Cyclam-basierten BP-Rezeptorlipid <b>11</b> .....	- 34 -
3.1.2. Synthese des Cyclam-basierten BP-Fluoreszenzrezeptors <b>12</b> .....	- 39 -
3.1.3. Synthese von Modellverbindungen für die Pinzette, Synthese der unsymmetrischen Pinzette <b>17</b> und Synthese des Rezeptors <b>19</b> .....	- 43 -
3.1.3. Synthese der Methacrylamid-basierten lipidischen Monomere <b>1-4</b> .....	- 55 -
<b>3.2. Proteinoberflächenanalyse .....</b>	<b>- 58 -</b>
<b>3.3. Molecular Modelling mit dem vereinfachten Rezeptor 11a und kurzen Arginin-Oligopeptiden .....</b>	<b>- 64 -</b>
<b>3.4. Untersuchungen des Rezeptorlipids 11 an der Luft-Wasser-Grenzfläche mittels der Filmwaagetchnik .....</b>	<b>- 71 -</b>
<b>3.4 Fluoreszenzmessungen .....</b>	<b>- 85 -</b>
<b>3.5 RIfS-Messungen .....</b>	<b>- 93 -</b>
<b>4. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK .....</b>	<b>- 135 -</b>
<b>5. EXPERIMENTELLER TEIL .....</b>	<b>- 144 -</b>
<b>5.1. Materialien.....</b>	<b>- 144 -</b>

---

<b>5.2. Methoden.....</b>	<b>- 147 -</b>
<b>5.3. Synthesen .....</b>	<b>- 152 -</b>
5.3.1. Synthese des Benzoessäure-Bisphosphonat-Rezeptors <b>24</b> .....	- 152 -
5.3.2. Synthese des Cyclam-basierten BP-Rezeptors mit Lipidanker <b>11</b> .....	- 156 -
5.3.3. Synthese des Cyclam-basierten BP-Rezeptors mit Dansyl-Markierung <b>12</b> .....	- 170 -
5.3.4. Synthese der asymmetrisch substituierten Pinzette anhand von Modellverbindungen ..	- 177 -
5.3.5. Synthese der asymmetrisch substituierten Phosphatpinzette <b>17</b> .....	- 181 -
5.3.6. Synthese des Cyclam-basierten Phosphatpinzetten-Rezeptors <b>19</b> .....	- 196 -
5.3.7. Synthese der Monomere <b>68, 73, 75, 2</b> (Monomer <b>1</b> - Monomer <b>4</b> ) .....	- 206 -
5.3.8. Polymerisationsversuche mit den Monomeren <b>68, 73, 75</b> und <b>2</b> .....	- 221 -
<b>5.4. Filmwaage-Messungen .....</b>	<b>- 223 -</b>
<b>5.5. RfS-Messungen .....</b>	<b>- 224 -</b>
<b>5.6. Fluoreszenz-Titrationen mit Peptiden und Proteinen.....</b>	<b>- 249 -</b>
<b>5.7. ITC-Messungen (Isotherme Titrationskalorimetrie) .....</b>	<b>- 267 -</b>
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>- 268 -</b>
<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>- 277 -</b>



---

## Abkürzungen

In der vorliegenden Arbeit wurden die folgenden Abkürzungen verwendet:

A	Adenin
Å	Angström    1 Å = 0.1 nm
abs.	absolutiert (wasserfrei)
Ac	Acetyl
ADH	Alkoholdehydrogenase
AIBN	Azoisobutyronitril
Arg / R	Arginin
Asp	Aspartat
Cyclam	1,4,8,11-Tetraazacyclooctatetradecan
ber.	berechnet
BIA	Bimolekulare Interaktionsanalyse
Boc	<i>tert.</i> -Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe
BP	Bisphosphonat
BR	Bakteriorhodopsin
BSA	Bovine Serum Albumin (Serumalbumin vom Rind)
C	Cytosin
CH	Cyclohexan
Chol (Chol-ds-DNA)	Cholesterol, 3'-Cholesterol-markierte-doppelstrang-DNA
Dansylchlorid	5-(Dimethylamino)naphthalin-1-sulfonylchlorid
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
DDQ	2,3-Dicyano-5,6-dichloro- <i>p</i> -benzochinon
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimid
DMAP	4- <i>N,N</i> -Dimethylaminopyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonulceinsäure
DODA	Diocetadecylamin
DODA-Suc	Bernsteinsäure- <i>N,N</i> -dioctadecylamid

---

ds-DNA	doppelsträngige DNA
EA	Ethylacetat, Essigsäureethylester
EDCI	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylcarbodiimid Hydrochlorid
EDIPA	<i>N</i> -Ethyl-diisopropylamin
eq.	Äquivalente
ESI	Elektronenspray Ionisation
Ethylacetat (EA)	Essigsäureethylester
EtOAc	Essigssäureethylester
G	Guanin
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure, $\gamma$ -Aminobutansäure
gef.	gefunden
ges.	Gesättigt
Glu	Glutamat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
His / H	Histidin
HMBC	Heteronuclear multiple bond connectivity
HMDS	Hexamethyldisilazan
HSA	Humanes Serumalbumin
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence
HOBt	Hydroxybenzotriazol
Hz	Hertz
HRMS	Hochaufgelöste Massenspektrometrie
kat.	katalytisch
LUV	large unilamellar vesicles (große Liposomen)
Lys / K	Lysin
M	Molar (mol/L)
MBP	Maltosebindendes Protein
$\mu$ M	Mikromolar ( $\mu$ M/L) $10^{-6}$ mol/L
MeOH	Methanol
MHz	Megahertz
mM	Millimolar (mmol/L) $10^{-3}$ mol/L
NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid
neg.	negativ

---

NEt <sub>3</sub>	Triethylamin
nM	Nanomolar (nmol/ L) 10 <sup>-9</sup> mol/L
NMR	Kernresonanzpektroskopie
NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin
NTA	<i>N</i> -Nitrilotriessigsäure
pa.	per analysis
PEG	Polyethylenglykol
PDB	Proteindatenbank
pos.	positiv
ppm	parts per million
PyBOP	(Benzotriazol-1-yl-oxy)tripyrrolidinophosphonium- hexafluorophosphat
PyCloP	Chlorotripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphat
R	Arginin
R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor
RIfS	Reflektometrische Interferenz Spektroskopie
RT	Raumtemperatur
SAM	self-assembled monolayer (Lipidmonolage)
Schmp.	Schmelzpunkt
SLB	Supported Lipid Bilayer (oberflächengetragene Lipiddoppelschicht)
SOPC	1-Stearoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
SPR	Oberflächenplasmoneresonanzspektroskopie
SUV	small unilamellar vesicles (kleine Liposomen)
T	Thymin
TBTU	<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium- tetrafluoroborat
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran

---

# 1. Einleitung

## 1.1. Molekulare Assemblierung von Proteinen auf Oberflächen

Die Biofunktionalisierung von Lipidoberflächen ist von grundlegender Bedeutung in den Material- und Biowissenschaften<sup>[1]</sup>. Sie finden Anwendung als katalytische Oberflächen, schaltbare Oberflächen, Modelle für molekulare und zelluläre Erkennungsprozesse und sie sind gut handhabbare Modelle für Liposomen. Ebenso finden sie Anwendung als (Bio-)Sensoren und leisten wichtige Dienste in der Medikamentenentwicklung<sup>[1]</sup>. Solche Proteinfelder (protein arrays) oder funktionale Biochips bieten großartige Möglichkeiten das Verständnis der Funktionsweise des Proteoms, d.h. der Gesamtheit aller Proteine in einem Lebewesen, zu erweitern, welches von zentraler Bedeutung für die Vitalprozesse in allen lebenden Organismen ist<sup>[2, 3]</sup>. Diese Möglichkeit, funktionsfähige Proteine auf der Oberfläche zu immobilisieren bietet nicht nur die Möglichkeit einen sogenannten Protein-Protein-Crosstalk zu beobachten, sondern auch einzelne Enzyme zu visualisieren oder ihre Aktivität und Wechselwirkungen zu charakterisieren. Damit können dann eventuell Katalysezyklen aufgeklärt werden<sup>[4-6]</sup>. Desweiteren liefert diese Methode die Möglichkeit biologische Sensoren aufzubauen, die besonders in der pharmazeutischen Forschung bei der Entwicklung neuer Arzneistoffe oder in der medizinischen Diagnostik einen großen Fortschritt ermöglichen dürften<sup>[7-9]</sup>. Als neues Schlagwort in diesem Forschungsfeld hat sich „*Nanodiagnostics*“ durchgesetzt<sup>[10]</sup>. Solche Protein-Arrays ermöglichen einen hohen Probendurchsatz im sogenannten High-throuput screening<sup>[11, 12]</sup>. Damit betritt man das aktuelle Forschungsfeld „*Proteomics*“<sup>[13, 14]</sup> – der umfassenden Erforschung des Proteoms – und bewegt sich im Grenzgebiet zwischen Chemie, Biochemie, Biologie, Medizin und Nanotechnologie<sup>[15]</sup>.

Um molekulare Erkennungsprozesse (Protein-Protein-Wechselwirkungen) untersuchen zu können, ist es von großer Bedeutung, Proteine auf Oberflächen in nativer, ausgerichteter und funktionsfähiger Form binden zu können<sup>[16]</sup>. Dieses ist zugleich auch die größte Herausforderung, da entsprechende spezifische Rezeptoren

entwickelt werden müssen, die Proteine ausreichend stark binden und dabei das Protein in seiner ursprünglichen Funktionalität erhalten können.

Eine Bindung des Rezeptors an der Proteinoberfläche kann schnell zur Denaturierung oder Verdeckung und Blockierung des aktiven Zentrums durch den auf der Oberfläche immobilisierten Rezeptor führen. Eine Protein-Protein-Wechselwirkung wäre dann nicht mehr zu beobachten oder überhaupt nicht mehr möglich.

Grundlegende Entwicklungsarbeit auf dem Gebiet der Proteinoberflächenenerkennung durch künstliche Rezeptoren wurde in den letzten 10 Jahren vor allem durch *A. D. Hamilton* geleistet<sup>[17-19]</sup>. Auf dem Gebiet der Erkennung von Proteinoberflächen mittels Gold-Nanopartikeln und Gold-Clustern machte *V. M. Rotello* wegweisende Entdeckungen<sup>[20, 21]</sup>. Bei der Proteinoberflächenenerkennung mittels maßgeschneiderter Polymere leisteten vor allem *V. M. Rotello* und *S. Thayumanavan* große Fortschritte<sup>[22-24]</sup>.

Ein anderer Ansatz, um mögliche Denaturierung der Proteine zu vermeiden, ist die Bindung der Proteine über, auf der Oberfläche, immobilisierte Rezeptoren, oder die direkte kovalente Bindung der Proteine auf der modifizierten Oberfläche. Dazu gibt es von verschiedenen Gruppen unterschiedliche Ansätze. Bei der nichtkovalenten Immobilisierung werden Rezeptoren für das jeweilige Protein auf die Oberfläche aufgebracht. Diese Rezeptoren werden entweder kovalent mit der Oberfläche verbunden (z. B.: über Thiole auf Goldoberflächen<sup>[25, 26]</sup>, oder auf Amino-PEG-Oberflächen mittels Kupplungsreagenzienchemie (DCC, DIC)<sup>[27, 28]</sup>, oder aber lose auf, auf der Oberfläche aufgebrachte Medien, z. B.: Lipidschichten, eingelagert<sup>[29-31]</sup>.

Diese Rezeptoren sollen die zu immobilisierenden Proteine nichtkovalent binden. Hierzu haben die Gruppe von *R. Tampé* und *J. Piehler* große Entwicklungsarbeit geleistet<sup>[28, 32-34]</sup>. In letzten Jahren ist die Bedeutung hierbei insbesondere für die als Tags bezeichneten kurzen Peptidsequenzen und die dazugehörigen Rezeptoren, immer größer geworden (z. B.: das Ni<sup>2+</sup>-NTA-His<sub>6</sub>-System, der Avidin-Biotin- oder Streptavidin-Biotin-Tag)<sup>[7, 35-40]</sup>. Rezeptoren für dieses unterschiedlichen Tags können einfach auf verschiedenen Oberflächen kovalent oder nichtkovalent befestigt werden (z. B.: Thiolrezeptoren auf Goldoberflächen). Auf diese Tags, oder Markierungen, wird in diesem Abschnitt später noch ausführlicher eingegangen.

Die spezifischste Möglichkeit Proteine auf Oberflächen zu immobilisieren besteht darin, die Oberfläche mit Antikörpern zu dekorieren, um damit die Proteine nichtkovalent binden zu können. Diese Methode weist eine weitaus höhere Affinität auf, als die Ni-NTA-His<sub>6</sub>-Tags oder das Avidin-Biotin-System<sup>[12, 41-43]</sup>.

Eine weitere Möglichkeit der Proteinimmobilisierung besteht in der direkten kovalenten Bindung des Proteins an die Oberfläche. Dabei können sowohl Glas, als auch Goldoberflächen eingesetzt werden. Die wohl einfachste kovalente Immobilisierungsmethode ist die Aktivierung der Oberfläche mit NHS-Estern (N-Hydroxysuccinimid), meist durch Thioalkyl-NHS-Ester, welche auf Goldoberflächen spontan kovalent gebundene SAM ausbilden. Diese immobilisierten NHS-Ester reagieren sofort mit primären Amin-Gruppen<sup>[44-48]</sup>. Eine weitere Möglichkeit zeigte *G. MacBeath* 2000, indem, auf mit Aldehydresten funktionalisierten Glaschips, Proteine mit ihren primären Aminfunktionen über Schiff'sche Base Bindungen kovalent verbunden werden<sup>[6]</sup>.

*J. A. Camarero* zeigte 2004 erstmals die kovalente Bindung der C-Termini von Proteinen an die N-Termini von mit Cystein-PEG-Linkern modifizierten Glasoberflächen mittels Expressed Protein Ligation (EPL). Dazu wurden rekombinante Proteine mit C-terminalen  $\alpha$ -Thioestern hergestellt, die mit den auf der Oberfläche immobilisierten Cysteinresten eine stabile Peptidbindung ausbilden (native chemical ligation)<sup>[49]</sup>. *Q. S. Yao* zeigte vorher, im Jahr 2002, die gleiche Methode, aber genau entgegengesetzt. Er funktionalisierte die Glasoberfläche mit C-terminalen  $\alpha$ -Thioestern und konnte diese mit N-terminalen Cysteinresten am Protein kovalent verknüpfen<sup>[36, 50]</sup>.

*C. R. Bertozzi* zeigte 2000, die Anwendung einer modifizierten Staudinger-Ligation um Peptidbindungen an Proteinen und an Zelloberflächen einführen zu können<sup>[51]</sup>. Diese Reaktion wurde 2006 von *H. Waldmann*, *C. M. Niemeyer* und *R. S. Goody* (MPI Dortmund) eingesetzt, um gentechnisch C-terminal-Azid-modifizierte Proteine auf Oberflächen zu immobilisieren<sup>[52]</sup>. Auch die Diels-Alder Reaktion wurde 2006 von *H. Waldmann* und *C. M. Niemeyer* 2006 zur Immobilisierung von Proteinen auf Glasoberflächen eingesetzt<sup>[53]</sup>.

Ebenfalls im Jahr 2006 wurde erstmalig die Cu(I)-katalysierte Huisgen 1,3-dipolare Azid-Alkin Cycloaddition zur Immobilisierung von Proteinen auf Oberflächen

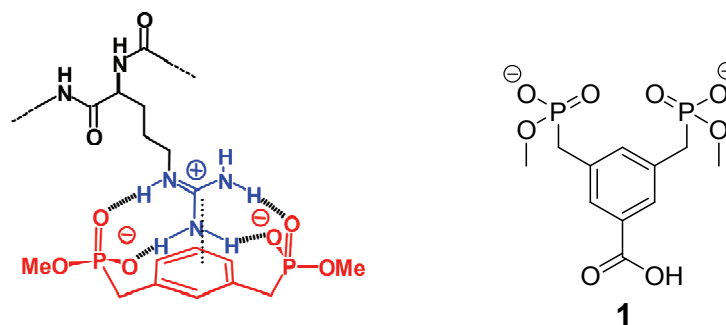
angewendet<sup>[54-56]</sup>. Dies geschah unabhängig voneinander von drei unterschiedlichen Gruppen. *C. C. Lin* (Taiwan), *C. D. Poulter* (Utah) und *M. D. Distefano* (Minnesota). Dazu wird die Oberfläche mit Aziden funktionalisiert. Diese Azide können mit Proteinen, welche so manipuliert sind, dass sie am C-Terminus eine Alkin-Funktion tragen, reagieren und eine kovalente Bindung zwischen Oberfläche und nativem Protein ausbilden. Diese Methode funktioniert auch, wenn auch etwas schlechter, wenn Alkine immobilisiert werden und diese mit Azid-markierten Proteinen reagieren. In diesem Jahr erst nutzte *C. A. Mirkin* die Click-Chemie, um Luciferase an Goldnanopartikeln zu immobilisieren<sup>[57]</sup>.

Auch über sogenannte Fangliganden (capture ligands) ist eine kovalente irreversible Immobilisierung von Proteinen möglich. Dabei ist die Orientierung der Proteine auf der Oberfläche genau vorgegeben. Dies erreichte *M. Mrksich* 2002 durch die Anwendung der Serinesterase Curtinase und des Proteins Calmodulin<sup>[58]</sup>. *J. A. Camarero* berichtete 2006 über einen gänzlich neuen Ansatz zur Protein-immobilisierung auf Oberflächen, und zwar über die Split-Inteinmethode mit anschließendem Transsplicing<sup>[59]</sup>. Dabei wurde ein Intein in zwei Teile fragmentiert, in das C- und das N-Intein. Das rekombinante Protein wird so manipuliert, dass es an einem C-Terminus mit dem N-Intein versehen ist, während das C-Intein-Fragment kovalent auf der Glasoberfläche immobilisiert wird. Wenn beide Inteinfragmente interagieren, fusionieren sie zu einem funktionsfähigen Intein auf der Oberfläche und das Protein ist fest gebunden. Nun findet anschließend der Splicing-Prozess statt und das Intein wird abgetrennt. Das Protein ist nun kovalent auf der Oberfläche gebunden.

Einen Überblick über kovalente und nicht kovalente Immobilisierung gibt *J. A. Camarero* von der *University of California*<sup>[60]</sup>. Die Möglichkeiten der Oberflächenmodifikationen sind extrem vielfältig und reichen bei Gold, Glas oder auch Silikon von der chemischen Modifizierung bis hin zu Physisorption und der Ausbildung von Lipiddoppelschichten, wie in Abschnitt 1.4 beschrieben<sup>[29, 61-64]</sup>.

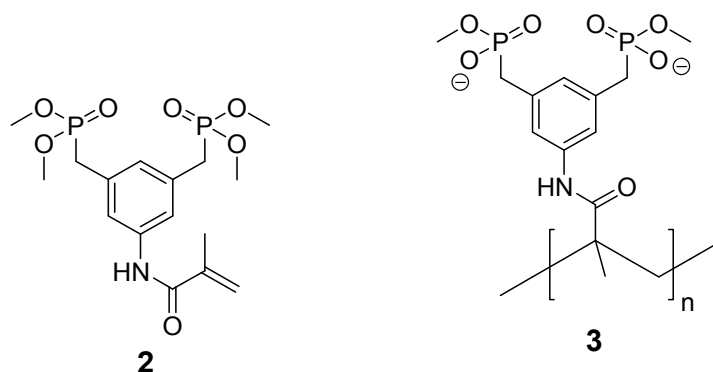


In unserem Arbeitskreis wurde das als Bisphosphonat **1** bezeichnete Bindungsmotiv (Abbildung 1) zur Oberflächenerkennung von Proteinen entwickelt, welches ein guter Rezeptor für die basischen Aminosäuren Arginin (Guanidinium-Kation) und Lysin (Ammonium-Ion) ist<sup>[65]</sup>. Diese werden durch verschiedene nichtkovalente Wechselwirkungen, wie Wasserstoffbrückenbindungen,  $\pi$ -Kation-Wechselwirkungen und elektrostatische Wechselwirkungen gebunden.



**Abbildung 1:** Bindungsmotiv Bisphosphonat mit Arginin-Rest (links) und Carbonsäure-Bisphosphonatpinzette **1** (rechts).

Da die Bindungseigenschaften dieses Bindungsmotivs mit einer Assoziationskonstante in wässriger Lösung von ungefähr  $K_a = 100 \text{ M}^{-1}$  doch ziemlich schwach ist (im Gegensatz zu  $K_a = 86000 \text{ M}^{-1}$  für Arginin in DMSO)<sup>[16]</sup>, wurde dieses Bindungsmotiv von C. Renner zu dem polymerisationsfähigen Monomer **2** weiterentwickelt und dieses durch radikalische Polymerisation zur Darstellung von Bisphosphonat-Homopolymeren **3** genutzt. Zur Veränderung der Bindungseigenschaften wurden diverse Monomere mit dem Bisphosphonatmonomer **2** copolymerisiert<sup>[16, 66]</sup>.



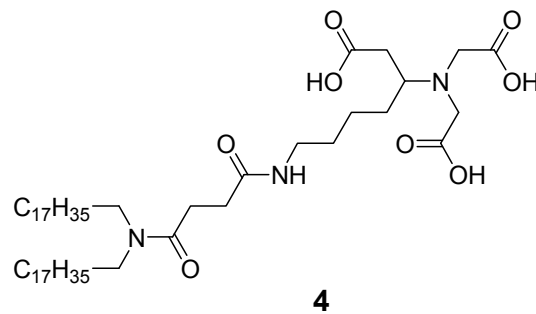
Somit konnte das Prinzip der Multivalenz ausgenutzt werden, wie es auch häufig in Oberflächenerkennungsprozessen in der Natur vorkommt<sup>[67]</sup>. Die Bindungseigen-

schaften des Bisphosphonatbindungsmotivs konnten so auf Affinitätskonstanten zu kleinen Argininpeptiden auf Werte von  $K_a = 10^4 \text{ M}^{-1}$  bis  $10^5 \text{ M}^{-1}$  gesteigert werden<sup>[16]</sup>. Erstmals gelang es *C. Renner* auch, diese Polymere auf einer oberflächen-gebundenen Polyethylenimin-Oberfläche zu immobilisieren und sowohl kurze Argininpeptide, als auch einige basische Proteine, wie z. B. Lysozym, Cytochrom C, Histon H1 und Trypsin auf der Oberfläche zu immobilisieren<sup>[16]</sup>. Diese Untersuchungen wurden mittels Rlf-Spektroskopie durchgeführt, die in Abschnitt 1.3 ausführlich erläutert wird. Die Proteine wurden hierbei aber ungeordnet und unausgerichtet gebunden, da der Rezeptor die basischen Aminosäuren auf der Proteinoberfläche bindet. Auch eine Funktionalitätseinschränkung der Proteine kann so nicht vollständig ausgeschlossen werden, da Arginin- und Lysin-Reste besonders häufig in der Nähe des aktiven Zentrums auf der Proteinoberfläche vorkommen, so dass dieses durch Rezeptorbindung verdeckt wird und damit blockiert ist<sup>[16]</sup>.

Aus diesem Grund wurde das grundlegende Prinzip der Einführung von Proteinmarkierungen, sogenannten „Tags“ etabliert. Das bedeutet, dass die Proteine gentechnisch so verändert werden, dass am N-terminalen oder am C-terminalen Rest eine kurze Sequenz verschiedener Peptide eingeführt werden kann. Die natürliche Faltung des Proteins und damit auch seine Bioaktivität wird davon meist nicht beeinflusst<sup>[68]</sup>. Eine Rezeptorbindung findet nicht mehr am „eigentlichen“ Protein statt, sondern an der Markierung, die nicht mehr zum ursprünglichen Protein gehört. Dadurch sollten so markierte Proteine in ihrer Funktion nicht beeinträchtigt werden<sup>[25]</sup>.

Nun ist es möglich das entsprechende Protein spezifisch für einen bestimmten Rezeptor zu markieren. Bahnbrechend für dieses Prinzip war die Entdeckung des  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA (*N*-Nitrilotriessigsäure) Rezeptors und dessen irreversible Bindung von kurzen Hexa-Histidin-Peptiden ( $\text{His}_6$ ) im Jahr 1988 durch *E. Hochuli*<sup>[69, 70]</sup> und des etwas später, im Jahr 1993, von *T. G. M. Schmidt* und *A. Skerra* entwickelten sogenannten Biotin-Streptavidin-Tags<sup>[71]</sup>.

In der Gruppe von *R. Tampé* wurden ab dem Jahr 1994  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Rezeptoren mit Lipidankern versehen, um Moleküle, wie das sogenannte NTA-DODA **4** zu erhalten.

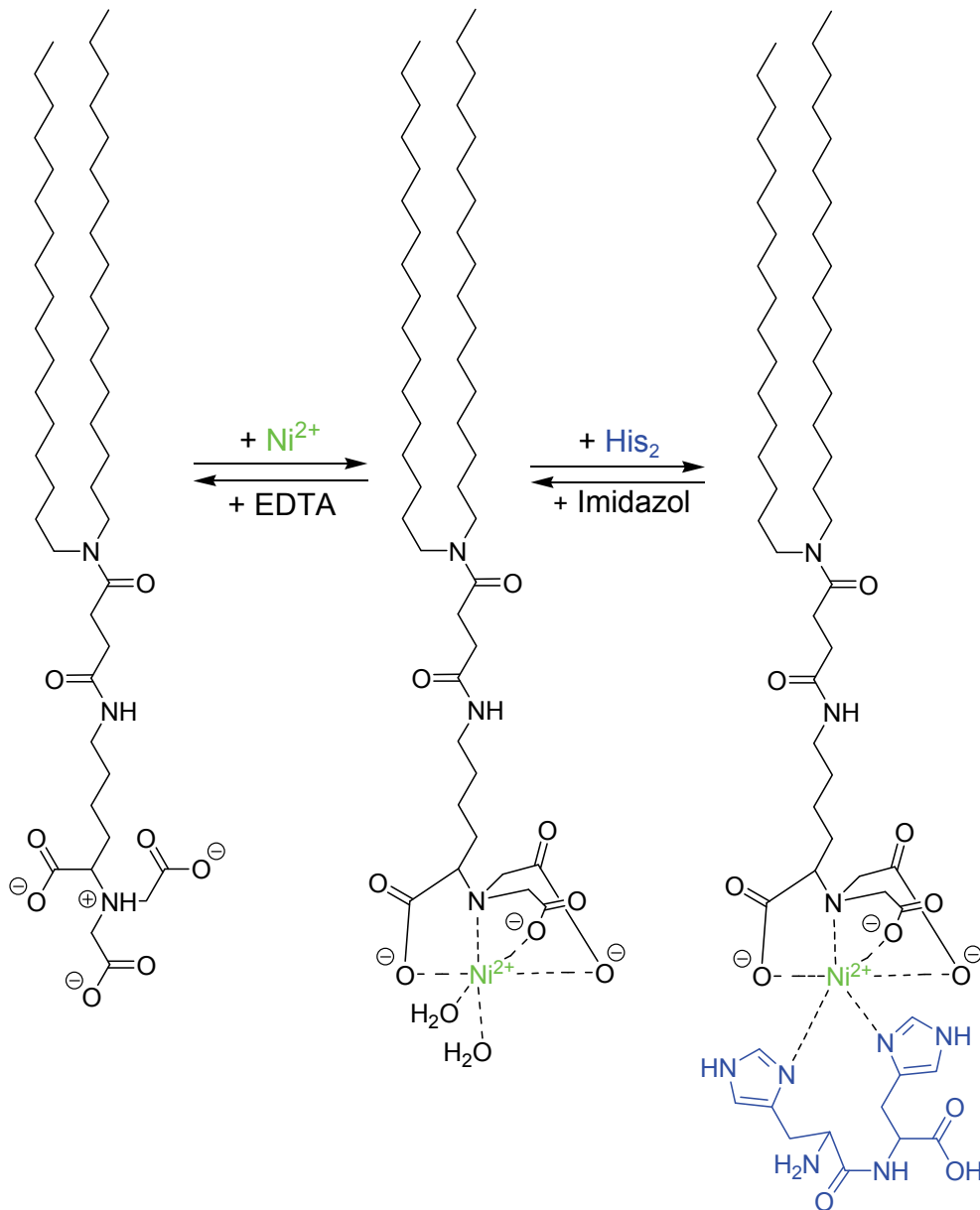


Diese Moleküle werden als Chelator-Lipide bezeichnet<sup>[72]</sup> und können in selbstassemblierten Lipidmonoschichten (SAMs) an der Luft-Wasser-Grenzfläche eingelagert werden. Auf diese Weise können Untersuchungen von Protein-Protein-Wechselwirkungen an Modelllipidschichten durchgeführt werden<sup>[73]</sup>. Der NTA-Kopf kann  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen chelatisieren. Dabei werden vier Ligandenplätze durch den tetravalenten NTA-Kopf, die übrigen zwei Plätze durch Wassermoleküle besetzt. Die beiden Aqua-Liganden können leicht durch zwei Histidin-Reste ausgetauscht werden und es bildet sich ein oktaedrischer  $\text{Ni}^{2+}$ -Komplex (Abbildung 2).

Dabei können die Histidin-Reste auch von einem mit His<sub>6</sub>-Tag markierten rekombinanten Protein stammen, welches auf diese Weise nichtkovalent, aber trotzdem extrem stark vom  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Rezeptor gebunden wird. Ein weiterer Vorteil dieses Systems ist, dass die starke Bindung von His-markierten Proteinen trotzdem kontrollierbar reversibel ist.

Unter physiologischen Bedingungen ist die Bindung irreversibel. Aber durch Zugabe des kompetitiven Liganden Imidazol oder des Metallionenchelators EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure), kann das Protein freigesetzt werden. Imidazol ist der beste Ligand für den  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Komplex und verdrängt das markierte Protein. Die Zugabe von EDTA, einem guten Chelator von  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen, entfernt die  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen aus dem NTA-Komplex, wodurch auch hierbei die Bindung des His-markierten Proteins aufgehoben wird<sup>[74]</sup>.

So wurde ein leistungsfähiges System entwickelt, um His-markierte Proteine in Lipidmonoschichten einlagern und dort untersuchen zu können<sup>[75]</sup>.



**Abbildung 2:** NTA-DODA **4** komplexiert Ni<sup>2+</sup>-Ionen und anschließend das Dihistidinpeptid (His<sub>2</sub>).

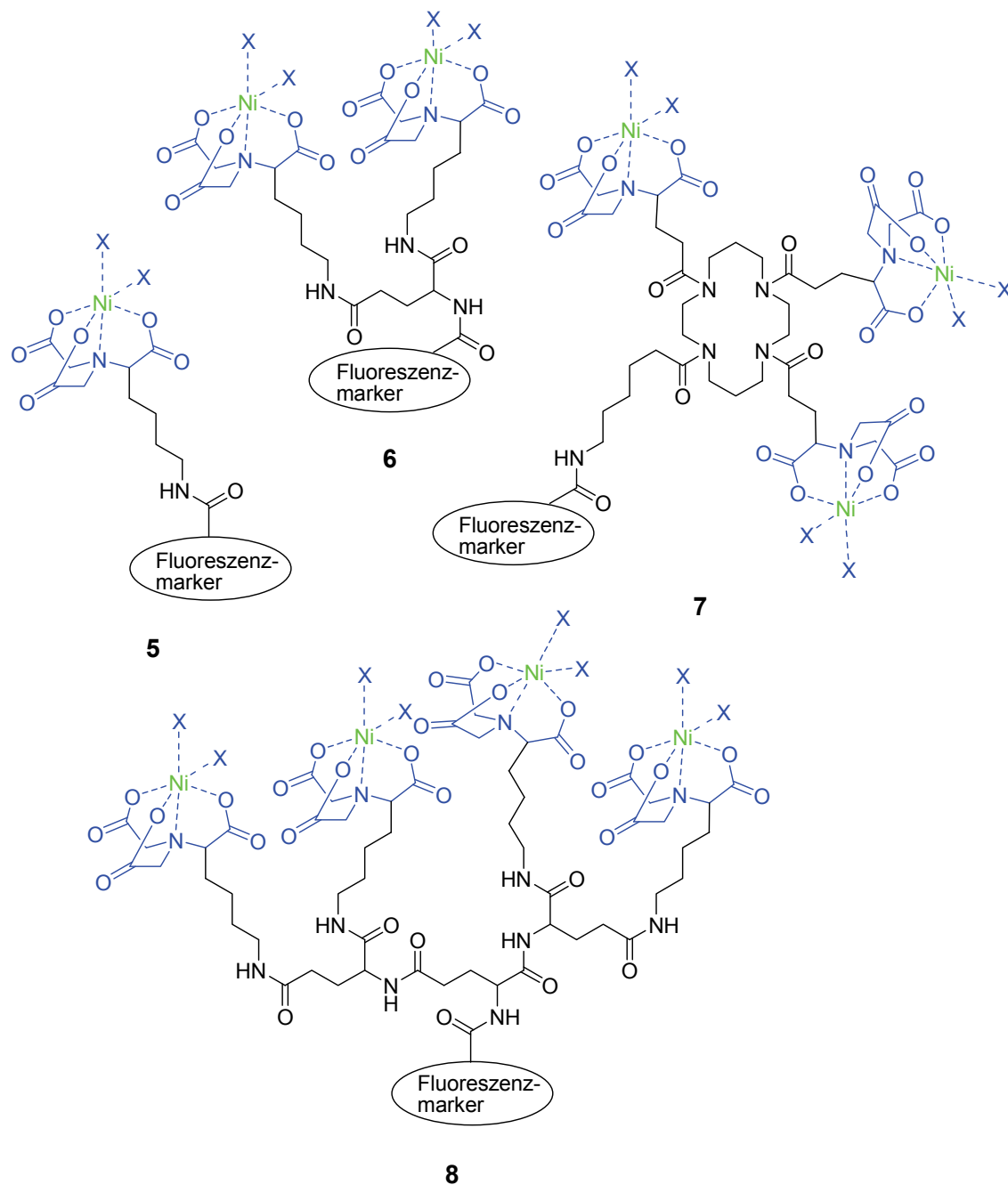
So lange die Immobilisierung von Proteinen auf festen Oberflächen noch nicht erreicht war, konnte das Metall-Chelatorlipid-Konzept von *R. Tampé* jedoch sein Potential noch nicht vollständig ausschöpfen<sup>[29]</sup>. Erst durch Übertragung von mit **4** dotierten Lipidmonoschichten von der Luft-Wasser-Grenzfläche auf feste Goldoberflächen konnten mit Rezeptoren dotierte Lipidmonoschichten auf festen Oberflächen erzeugt werden. Damit war es möglich, eine orientierte Immobilisierung von Proteinen auf gut geordneten und organisierten Lipidmonoschichten zu erhalten<sup>[29]</sup>. Es konnten erstmals oberflächensensitive Analysemethoden eingesetzt

werden, um Protein-Protein-Wechselwirkungen und molekulare Erkennungsprozesse auf der festen Phase zu untersuchen<sup>[75]</sup>.

Im Gegensatz dazu bilden auf Oberflächen immobilisierte Polymere als Rezeptoren, wie sie von *C. Renner* benutzt wurden, eine ungeordnete und unorganisierte Matrix, die zu einer nicht ausgerichteten Bindung von Proteinen führt<sup>[14]</sup>.

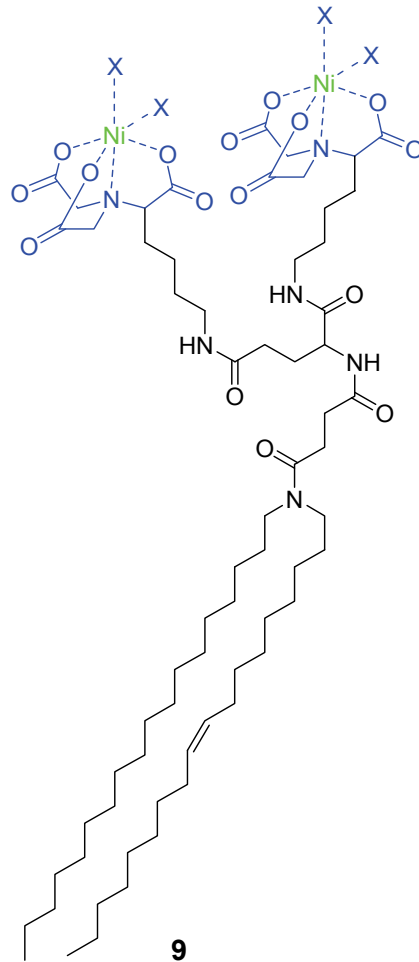
Anschließend gelang es *R. Tampé* Lipiddoppelschichten auf unterschiedlichen festen Oberflächen (Gold, Glas, Silica) durch Vesikelfusion (siehe Abschnitt 1.4) zu erzeugen und auf diese Weise mit Rezeptoren dotierte künstliche Membranen darzustellen<sup>[76]</sup>. Es konnten funktionale, zweidimensional orientierte Proteinfelder auf diesen künstlichen Membranen erzeugt werden, die mittels AFM, SPR, RfS und TIRF untersucht werden konnten<sup>[29, 76]</sup>.

Das schon erwähnte Prinzip der Multivalenz, welches in unserer Arbeitsgruppe durch die Polymerisation des Bisphosphonatbindungsmotivs durch *C. Renner* eine Verbesserung der Bindungseigenschaften zeigte, wurde auch in der Gruppe von *R. Tampé* zusammen mit *J. Piehler* für das  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Bindungsmotiv durchgeführt. Das NTA-DODA **4** wurde so weiterentwickelt, dass zwei bis vier NTA-Rezeptoren in einem Molekül vorhanden sind. Diese Untersuchungen wurden jedoch zunächst mittels Fluoreszenzmarkierung in Lösung und nicht auf Oberflächen durchgeführt. Dazu wurden die Moleküle *mono*-NTA-Fluo **5**, *bis*-NTA-Fluo **6**, *tris*-NTA-Fluo **7** und *tetrakis*-NTA-Fluo **8** synthetisiert<sup>[34]</sup>.



Auch hier konnte eine Steigerung der Bindung zu Histidin-Tags festgestellt werden, die von **5** – **7** über vier Größenordnungen zunahm. Lag die Dissoziationskonstante  $K_D$  für das *mono*-NTA-Fluo **5** im mikromolaren (5  $\mu$ M) Bereich, ist für *bis*-NTA-Fluo **6** eine  $K_D$  im nanomolaren Bereich (10 nM) und für das *tris*-NTA-Fluo **6** eine subnanomolare Dissoziationskonstante (0.14 nM) gemessen worden. Lediglich für das *tetrakis*-NTA-Fluo **7** ist kein weiterer Anstieg der Bindungsstärke zu beobachten ( $K_D = 1$  nM), was wahrscheinlich an der großen Flexibilität dieses Moleküls liegt<sup>[34, 77]</sup>. Das gleiche Konzept wurde von *J. Piehler* anschließend für auf Oberflächen immobilisierten Lipiddoppelschichten (SLB) angewendet. Ein zum DODA-*mono*-

NTA **4** äquivalentes ODEODA-*bis*-NTA **9** (Octadec-9-enyloctadecylamin) wurde synthetisiert und eine Steigerung der Bindungseigenschaften gegenüber nur einem NTA-Rezeptor-Kopf konnte bestätigt werden<sup>[78-80]</sup>.



Dieses Konzept von *J. Piehler* und *R. Tampé* erlaubt die reversible und orientierte Immobilisierung von mit Hexa-Histidin-Tag (His<sub>6</sub>) markierten Proteinen auf fluiden, künstlichen Lipiddoppelschichten, die ihrerseits auf Oberflächen (SLBs) immobilisiert sind. Eine Untersuchung der Oberflächenprozesse, d.h. der bimolekularen Interaktionen auf der Oberfläche ist mittels oberflächensensitiven Techniken (RIfS, AFM, SPR, TIRF) in Echtzeit möglich. Protein-Protein-Wechselwirkungen auf Membranen können so ebenso untersucht werden, wie Protein-Ligand-Interaktionen. Auch Wechselwirkungen zwischen membrangebundenen Proteinen (Intermembranproteinen) können analysiert werden. Künstliche Membranen auf Oberflächen sind ein leistungsfähiges Werkzeug, um biophysikalische Vorgänge von Proteinen auf Lipidoberflächen zu erforschen, können aber nicht uneingeschränkt in den zellulären Kontext übertragen werden<sup>[80]</sup>.

## 1.2. Optische (Bio)Sensoren für die Analyse von bimolekularen Wechselwirkungen (BIA)

In den letzten zwei Jahrzehnten sind die markierungsfreien optischen Analysemethoden für die Beobachtung von Molekül-Molekül Wechselwirkungen sehr in den Vordergrund gerückt<sup>[81]</sup>. Dies hängt einerseits mit dem extremen Bedeutungsgewinn der medizinisch-biologischen (bioorganischen) Chemie, andererseits mit den großen Fortschritten in der Arzneimittelentwicklung und der biologisch-medizinischen Forschung zusammen<sup>[82, 83]</sup>. Alle diese Methoden, die vor allem seit den 1990er Jahren auch kommerziell verfügbar sind<sup>[81]</sup>, haben gemeinsam, dass ein Rezeptor auf einer Oberfläche immobilisiert wird und ein Ligand, dessen Bindungseigenschaften zum immobilisierten Rezeptor untersucht werden sollen, in Lösung über die Oberfläche gespült wird. Änderungen auf der Oberfläche können mit den optischen Sensoren erfasst und ausgewertet werden. Diese Methoden haben sich zur Untersuchung von Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen<sup>[82, 84]</sup>, Antikörperentwicklung<sup>[85]</sup>, Rezeptor-Ligand-<sup>[48, 86-88]</sup>, Protein-DNA-<sup>[89, 90]</sup> und DNA-DNA-Wechselwirkungen<sup>[91, 92]</sup> als hervorragend geeignet erwiesen.

Bevor diese optischen Sensoren den Markt eroberten, wurden bimolekulare Wechselwirkungen hauptsächlich mit entweder radioaktiv- oder fluoreszenzmarkierten Liganden oder Rezeptoren durchgeführt<sup>[93]</sup>. Diese kostspielige und zum Teil auch sehr aufwendige Prozedur, die zudem auch die zu untersuchenden Wechselwirkungen beeinflussen kann, wird mit dem Einsatz der meisten optischen Sensoren, die im Folgenden besprochen werden, überflüssig<sup>[93]</sup>. Die optischen Sensoren erkennen die Bindung auf der Oberfläche, am Rezeptor, durch Änderung einer physikalischen Größe (Änderung des Brechungsindex oder der physikalischen oder optischen Schichtdicke)<sup>[94]</sup>. Die optischen Sensoren sind somit markierungsfrei und zeigen intermolekulare Wechselwirkungen in Echtzeit.

Als erste optische Methode zur Beobachtung von bimolekularen Wechselwirkungen auf der Oberfläche in Echtzeit wurde 1952 die Null-Ellipsometrie von *H. J. Trurnit*<sup>[95]</sup> eingesetzt. Er beobachtete die Wechselwirkung zwischen immobilisiertem BSA und Chymotrypsin. Für die nächsten 30 Jahre war nun die Ellipsometrie die einzige



markierungsfreie Methode, um Wechselwirkungen an der flüssig-festen Grenzphase zu beobachten<sup>[81]</sup>. Die Funktionsweise besteht darin, dass linear polarisiertes Licht (Feldvektor zeigt immer in die gleiche Richtung) in einem bestimmten Winkel (meist zwischen 60 und 70°) auf die Probe fällt. Je nach Brechungsindex der Probe (auf der Oberfläche) wird das reflektierte Licht ellipitisch polarisiert (Feldvektor rotiert um Wellenvektor) und ändert somit seinen Polarisationsgrad, der vom Detektor erfasst wird<sup>[96, 97]</sup>. Wenn der Brechungsindex bekannt ist, kann aus der Änderung des Polarisationsgrades die Schichtdicke berechnet werden. Als Oberflächensubstrate können bei diesem Verfahren sowohl Gold- als auch Glassubstrate zum Einsatz kommen<sup>[98]</sup>. Der Messbereich für die Schichtdicken liegt im Bereich von 1 nm bis 100 µm<sup>[99]</sup>.

Im Jahr 1983 zeigte *B. Liedberg* den Gebrauch der SPR für die markierungsfreie BIA<sup>[100]</sup>. Seitdem ist sie bis heute, trotz ihrer hohen Betriebskosten, die führende Technik für Untersuchungen von bimolekularen Wechselwirkungen auf Oberflächen geblieben. Als Oberflächensubstrate werden Goldchips eingesetzt. Zudem ist diese Methode sehr temperaturempfindlich, da sie den sehr stark temperaturabhängigen Brechungsindex zur Bestimmung von Schichtdicken nutzt<sup>[101]</sup>.

Bei dieser Methode wird linear polarisiertes Licht von unten auf einen Goldchip gestrahlt. Auf diesem Goldsubstrat befindet sich die Probe. Durch das in einem bestimmten Einfallswinkel einfallende Licht werden Oberflächenplasmonen im Metall angeregt und es entsteht eine evaneszente Welle, die in die Probe eindringt. Je nach Brechungsindex der Probe dringt die Welle unterschiedlich stark in die Oberfläche ein<sup>[102]</sup>. Durch die Wechselwirkung des eingestrahlt Lichts mit den Oberflächenplasmonen, geht ein kleiner Betrag an Energie des eingestrahlt Lichts verloren. Das reflektierte Licht verändert so die Intensität und den Reflektionswinkel, der dann nicht mehr dem Einfallswinkel gleicht. Aus der Veränderung des Ausfallwinkels und der Änderung der Intensität des reflektierten Lichts kann der lokale Brechungsindex bzw. die Brechungsindexänderung an der Substratoberfläche detektiert werden<sup>[103]</sup>.

Kurz gesagt beruht die Methode auf der Änderung der Resonanzwellenlänge der Oberflächenplasmonen, die vom Brechungsindex an der Oberfläche abhängt<sup>[104, 105]</sup>. Es handelt sich bei der SPR um eine hoch sensible Messmethode, die sehr empfindlich auf kleinste Brechungsindexänderungen reagiert<sup>[101]</sup>. Dies macht die SPR leider auch zu einer sehr störanfälligen Messmethode. Ein weiterer Nachteil ist,

dass eigentlich nur auf Lipidmonoschichten gearbeitet werden kann, die über Thiole auf der Goldoberfläche adsorbiert werden. Eine Aufbringung von Lipiddoppelschichten ist nicht möglich, jedenfalls nicht über die einfache Vesikelfusion. Präparationen der Oberflächen sind somit zeitlich aufwendiger, als bei der Rlf-Spektroskopie. Die Nachweisgrenze für Schichtdickenänderungen liegt bei unter  $1 \text{ pg/mm}^2$  <sup>[106]</sup>. Seit 1990 gibt es ein SPR-Spektrometer im Handel, das *BIACore 2000* der Firma *BIACORE, Uppsala* (Schweden) (ehemals *Pharmacia Biosensor*)<sup>[81]</sup>.

1988 entwickelten *P. M. Nellen et al.* die Gitterauskoppler-Methode (Grating Coupler)<sup>[107]</sup>. Auch diese Methode beruht, wie die SPR, auf dem quantenphysikalischen Phänomen der evaneszenten Welle. Es werden sowohl die lokale Änderung des Brechungsindex, als auch die Schichtdicke gemessen. Als Substrate dienen Glaschips mit einer  $\text{TiO}_2$ -Beschichtung<sup>[108]</sup>. Linear polarisiertes Licht wird auf ein optisches Gitter oberhalb der Probe geleitet, wo es gestreut wird und anschließend in einen planaren Wellenleiter geleitet wird. Es breitet sich im Wellenleiter über tausende interne Totalreflektionen aus. Bei einem wohldefinierten Einfallswinkel wird die Phasenverschiebung während der internen Reflektion den Wert Null annehmen, wobei eine evaneszente Welle entsteht, die in die Probe eindringt. Die Änderung des Brechungsindex der Probe kann auf diese Weise durch Veränderung des Einfallswinkels des Lichts detektiert werden<sup>[108, 109]</sup>.

Diese Methode ist mit einer Nachweisgrenze der Schichtdickenänderung von  $10 \text{ pg/mm}^2$  nicht ganz so empfindlich wie die SPR<sup>[109]</sup>, aber ähnlich anfällig gegenüber Temperaturschwankungen. Ein weiterer Vorteil gegenüber der SPR ist, dass nicht nur der Brechungsindex gemessen wird, sondern auch simultan die Schichtdicke. Mit diesen beiden Werten kann die auf der Oberfläche gebundene Masse direkt berechnet werden. Seit 1991 ist ein Gerät für diese Methode im Handel erhältlich, nämlich das *BIOS-1* der Firma *ASI, Zürich* (Schweiz).

Die Multi-Angel-Brewster Angel Reflectometrie (MABAR) wurde 1988 von *U. Stange et al.* als Biosensor zur Beobachtung der Reaktion zwischen menschlichen Serumalbumin-Antikörpern (anti-HSA) und auf silikonbeschichteten Oberflächen immobilisiertem HSA eingesetzt. Die Menge an Antigen-Antikörperkomplex auf der Oberfläche konnte bestimmt werden<sup>[110]</sup>. Bei dieser Methode handelt es sich um eine Vereinfachung der Ellipsometrie.

Sie basiert auf dem Phänomen, dass wenn linear polarisiertes Licht in einem bestimmten Winkel (dem Brewster Winkel oder Polarisationswinkel) auf eine reflektierende Schicht auftrifft (wie die Grenzphase zwischen zwei verschiedenen Brechungsindices), dieses kaum noch reflektiert wird und so ein Reflektionsminimum auftritt. Dieser Einstrahlungswinkel wird pseudo-Brewster Winkel genannt<sup>[111]</sup>. Für hochreflektierende Materialien mit niedriger Absorption (wie z.B. Silikon) ist dieses Reflektionsminimum sehr ausgeprägt. Sind organische Moleküle, wie Proteine, auf einer solchen Oberfläche vorhanden, wird das Reflektionsminimum für die reflektierte Lichtintensität, die im pseudo-Brewster Winkel eingestrahlt wird, erhöht<sup>[111]</sup>. Um diesen Effekt noch zu verstärken, wird auf dem Silikon eine 1-3 nm dicke Schicht (optische Kontrastschicht) von  $\text{TiO}_2$  aufgebracht<sup>[111]</sup>. Mit zunehmendem Brechungsindex wird die Reflexionsintensität des im pseudo-Brewster Winkel eingestrahnten Lichts erhöht. Diese Intensitätszunahme kann bestimmt werden und daraus die Schichtdickenänderung berechnet werden.

Diese Methode findet jedoch in der letzten Zeit keine große Anwendung als Immunosensor, da die Detektionsgrenze sehr hoch liegt und es empfindlichere Methoden gibt, die auch schon, im Gegensatz zu dieser Technik, im Handel erhältlich sind<sup>[81]</sup>.

*R. Cush* nutzte 1993 erstmals die Resonanzspiegel-Methode (Resonant Mirror) zur BIA<sup>[112]</sup>, und diese Methode wurde zeitgleich mit dem Gerät *IASys plus* der Firma *Fisons Applied Sensor Technology, Cambridge* (England) auf den Markt gebracht<sup>[81]</sup>.

Auch bei dieser Methode wird das Phänomen der evaneszenten Welle ausgenutzt. Es handelt sich um eine Mischung zwischen der SPR und der Gitterauskoppler-Technik. Linear polarisiertes Licht wird durch ein Prisma auf die Probe gestrahlt und trifft nun nicht auf eine Goldoberfläche, wie beim SPR, sondern auf eine dielektrische Resonanzschicht (ca. 100 nm dick) aus Titan. Wenn der Lichtstrahl in einem bestimmten Winkel auf die Resonanzschicht trifft, so wird dort eine evaneszente Welle erzeugt, also nur, wenn eine Phasenübereinstimmung zwischen der Resonanzschicht und dem eingestrahnten Licht herrscht<sup>[112]</sup>. Das Licht wird totalreflektiert und tritt in einem veränderten Austrittswinkel aus dem Prisma aus, so dass aus der Änderung des Winkels die Änderung des Brechungsindex berechnet werden kann<sup>[102]</sup>. Die Detektionsgrenze liegt bei  $10 \text{ pg/mm}^2$ <sup>[81]</sup>.

Die totale interne Reflektionsfluoreszenz (TIRF)-Spektroskopie wurde zum Nachweis der Adsorption von Proteinen auf einer Oberfläche erstmalig 1977 von *R. W. Watkins* und *C. R. Robertson* angewendet<sup>[113]</sup>. Sie untersuchten die Adsorption von fluoresceinmarkiertem Rinder-IgG auf Silikonoberflächen. Die Anwendungsbreite der TIRF-Spektroskopie als Biosensor hat bis in die letzten Jahre erheblich zugenommen; so hat die Gruppe um *G. Gauglitz* 2005 einen auf TIRF basierenden ultrasensitiven Biosensor zur Qualitätskontrolle von Milch entwickelt<sup>[114]</sup>. Seit 2004 ist auch ein Gerät im Handel und zwar der *FluoroGazer* der Firma *TIRF Technologies*, Morrisville (USA).

Zu Beginn ist hier zu erwähnen, dass bei dieser Methode nicht auf einen Fluoreszenzmarker des Analyten verzichtet werden kann. Es handelt sich also bei dieser Methode nicht um eine markierungsfreie Analysemethode. Die Markierungsfreiheit wurde zugunsten der höheren Spezifität und der niedrigeren Nachweisgrenze, im Vergleich zur SPR, aufgegeben. Bei der TIRF-Spektroskopie nutzt man den gleichen Aufbau und das gleiche Funktionsprinzip, wie bei der Oberflächenplasmonenresonanz. Zusätzlich wird jedoch noch ein Fluoreszenzdetektor oberhalb der Probe eingebaut. Eine Kombination von SPR und TIRF bietet sich an, um intermolekulare Wechselwirkungen zwischen zwei Molekülen zu untersuchen, von denen nur eins den Fluoreszenzmarker trägt. So kann bei der Messungen zwischen beiden Molekülen unterschieden werden<sup>[80]</sup>.

Die entstehende evaneszente Welle ist in der Lage, auf der Oberfläche gebundene und mit Fluoreszenzmarker versehene Analyten anzuregen. Anhand der Fluoreszenzintensität kann die Menge gebundenen Analyts auf der Oberfläche berechnet werden<sup>[115]</sup>. Bei der TIRF handelt es sich um eine sehr spezifische Methode, die nur mit Fluoreszenzmarker versehene Analyten erfasst. Die Detektionsgrenze liegt theoretisch bei einem Molekül auf der Oberfläche und man kann die TIRF so zu den Einzelmolekülnachweismethoden zählen<sup>[116]</sup>.

Als neueste Technik unter den optischen Sensoren kann die reflektometrische Interferenz Spektroskopie (RIfS), welche im nächsten (Abschnitt 1.3) ausführlicher besprochen wird, genannt werden, da sie für die Messungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit angewendet wurde. Besonders bedeutend ist die RIfS für Untersuchungen auf Lipiddoppelschichten, da die meisten bereits schon erwähnten Methoden, nur Untersuchungen auf Monoschichten zulassen<sup>[117]</sup>. Zudem lassen sich

Lipiddoppelschichten relativ schnell und einfach durch Vesikelfusion<sup>[97, 118]</sup> darstellen und es sind keine aufwendigen chemischen Modifikationen der Substrate notwendig.

Aber auch kovalente Modifikationen der Oberflächen können ohne Probleme vorgenommen werden, z.B. durch Kupplungsreagenzienchemie (DCC, DIC, HCTU). So können z.B. Aminodextran, Polyethylenimin, Polyethylenglykol oder Maltodextrin kovalent auf dem Glaschip gebunden werden<sup>[61-63]</sup>. Es ist also eine vielfältige Oberflächenbeschaffenheit möglich und so ist die Einsatzbreite der RfS auch sehr groß. Ein weiterer Vorteil für die RfS ist der relativ günstige Betrieb (Glassubstrate vs. Goldoberflächen) und die geringe Temperaturempfindlichkeit.

### 1.3. Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIfS)

Die RIfS-Technik beruht auf dem Prinzip der optischen Interferenz von weißem Licht an dünnen, durchsichtigen Schichten (Medienübergängen, Grenzflächen), mit deren Hilfe sich die optische Schichtdicke bestimmen lässt<sup>[119, 120]</sup>. Es handelt sich hierbei also um ein direktes optisches Verfahren, auf dessen Weise Markierungen, wie z. B.: Fluoreszenzmarker oder radioaktive Markierungen, welche die tatsächlichen chemischen, biologischen oder physikalischen Eigenschaften des Analyten gegebenenfalls beeinflussen oder sogar komplett einschränken können, vermieden werden<sup>[117, 121]</sup>.

Die RIf-Spektroskopie ist also eine sogenannte markierungsfreie Analysemethode und eignet sich somit hervorragend zur Untersuchung von bimolekularen Wechselwirkungen (BIA)<sup>[120]</sup>. Ein weiterer Vorteil dieses optischen Analyseverfahrens ist die Möglichkeit der Beobachtung der molekularen Wechselwirkungen in Echtzeit. Dies ist insbesondere für immunologische Assays von Bedeutung<sup>[122]</sup>. Auch die enorme Empfindlichkeit dieser Methode ist bemerkenswert. Die Nachweisgrenze der Analyten liegt im subnanomolaren Bereich<sup>[123]</sup>. Ein Anstieg der optischen Schichtdicke von 1 nm entspricht ungefähr einer Oberflächenbelegung von 1 ng/mm<sup>2</sup><sup>[29, 106, 123]</sup>.

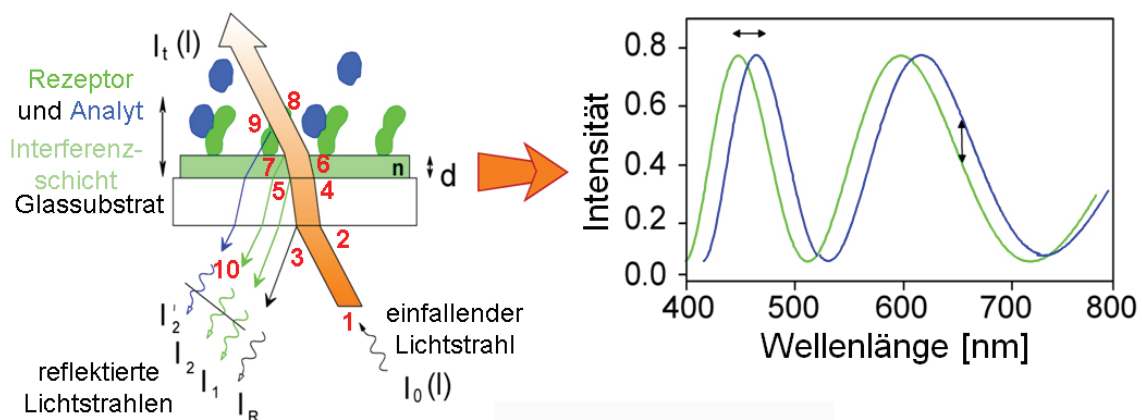
Da monochromatische Messungen nicht zwischen verschiedenen Oberflächen und unterschiedlichen Volumina unterscheiden können, muss der Brechungsindex der verschiedenen Medien bekannt sein, um eine Aussage über die tatsächliche (physikalische) Schichtdicke machen zu können.

Erstmals wurde die Interferenz von weißem Licht zur Messung von Schichtdicken im Jahr 1937 angewendet. *I. Langmuir*, *K. Blodgett* und *V. J. Schäfer* nutzten sie, um die Dicke von Proteinfilmen zu bestimmen<sup>[124, 125]</sup>. *G. Gauglitz* begann dann diese Methode in den 1990er Jahren zu verfeinern und systematisch für die bimolekulare Interaktionsanalyse einzusetzen<sup>[81, 87, 90, 93, 101, 102, 106, 119, 123, 126-133]</sup>.

Auf diesen Erfahrungen beruhend, wurde dann auch das für diese Arbeit eingesetzte und im Handel erwerbliche Spektrometer der Firma *Analytik Jena AG, Jena* entwickelt<sup>[134]</sup>. Im Gegensatz zu anderen optischen Detektionsmethoden für die BIA, wie z. B. SPR oder Ellipsometrie, ist die RIfS nicht ganz so empfindlich gegenüber

Temperaturschwankungen<sup>[120]</sup>, da hier nicht die Änderung des Brechungsindex betrachtet wird, sondern die Veränderung der Schichtdicke. Da der Brechungsindex in extremer Weise von der Temperatur abhängig ist, sind Methoden wie die SPR natürlich auch extrem temperaturabhängig, was den apparativ bedingten Aufbau vor große Ansprüche stellt, um eine konstante Temperatur während des gesamten Messvorgangs zu gewährleisten.

Bei der RI-S wird dieses Problem umgangen. Da der Brechungsindex, wie bereits oben erwähnt, temperaturabhängig ist, er aber auch von der Dichte abhängt, die wiederum von der thermischen Ausdehnung abhängig ist, nimmt der Brechungsindex mit steigender Temperatur ab. Bei thermischer Ausdehnung der Schicht steigt die physikalische Schichtdicke  $d$  an. Diese beiden gegenläufigen temperaturbedingten Effekte sind für die geringe Temperaturempfindlichkeit bei der Messung der optischen Schichtdicke verantwortlich<sup>[120]</sup>.



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung von Reflexionen in einem Grenzphasensystem mit Interferenzspektrum<sup>[129]</sup>.

In Abbildung 3 ist gezeigt, wie ein Lichtstrahl (1) mit einer Wellenlänge  $\lambda$  von unten durch das Glassubstrat auf die Interferenzschicht mit dem Brechungsindex  $n$  und der Dicke  $d$  fällt. Beim Auftreffen des Lichtstrahls auf das Glassubstrat (2) wird ein Teil des Lichtstrahls gebrochen und geht weiter durch das Multischichtsystem, der andere Teil wird reflektiert (3). Beim Auftreffen auf die Interferenzschicht (4) wird der Lichtstrahl an der Grenzfläche zum Teil wieder reflektiert (5) und zum Teil gebrochen. Trifft der gebrochene Strahl an der nächsten Grenzfläche auf die Oberfläche mit dem Rezeptor und den gebundenen Analyten (6), wird der Lichtstrahl abermals reflektiert (7) und gebrochen. Beim Auftreffen auf ein anderes Medium mit

einem anderen Brechungsindex (8) (wie z.B. Puffer) wiederholt sich die Reflektion und Lichtbrechung abermals (9).

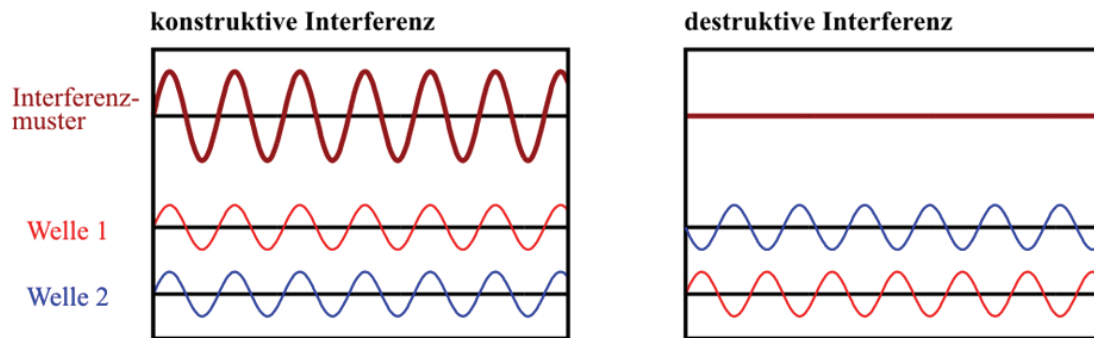
Die reflektierten Lichtstrahlen (10) werden beim Austritt aus dem Medium ebenfalls wieder gebrochen. Die Interferenz zwischen den Strahlen  $I_2$  und  $I_2'$ , also dem Strahl, der beim Übergang von der Interferenzschicht in die Analyt/Rezeptor Grenzschicht reflektiert wird (7) und dem Strahl, der beim Übergang in die oberhalb der gebundenen Schicht befindlichen Pufferlösung reflektiert wird (9), ist für die Bestimmung der optischen Schichtdicke von Bedeutung.  $I_R$  ist der an der Glasoberfläche reflektierte Strahl und dient als Referenzstrahl für die eingestrahle und reflektierte Lichtintensität.

Zwischen den Lichtstrahlen  $I_2$  und  $I_2'$  kommt es aufgrund der unterschiedlichen Wegstrecken zu der Phasendifferenz  $\Delta\varphi$ , also der physikalischen Schichtdicke des Mediums  $d$ . Aus dieser Phasenänderung, bedingt durch die Reflektion  $\varphi_{\text{refl}}$  an unterschiedlichen Schichten, ergibt sich eine Veränderung der Lichtintensität der reflektierten Strahlen, die auf eine Interferenz (die entweder konstruktiv oder destruktiv sein kann) (Abbildung 4) zurückzuführen ist. Kurz gesagt, die reflektierten Teilstrahlen  $I_2$  und  $I_2'$  erzeugen infolge der Phasendifferenz ein Interferenzmuster, woraus die optische Schichtdicke berechnet werden kann. Durch die Interferenz kommt es im reflektierten Spektrum (Interferrogramm) zur Verschiebung der Extrempunkte und an einer bestimmten Wellenlänge zur Änderung der Lichtintensität (Abbildung 3, rechts). Diese Verschiebungen können mit einem Diodenfeld-Spektrometer aufgenommen und analysiert werden.

Jede Änderung der Schichtdicke verändert die Weglänge des reflektierten Lichtstrahls und somit die Phasendifferenz. Die Phasendifferenz  $\Delta\varphi$  ist mit den übrigen Größen gemäß Gleichung 1 verknüpft.

$$\Delta\varphi = \frac{2nd}{\lambda + \varphi_{\text{refl}}} \quad (\text{Gleichung 1})$$





**Abbildung 4:** Überlagerung von Wellen führt zu Interferenz. Bei der konstruktiven Interferenz kommt es zur Erhöhung der Lichtintensität, bei destruktiver Interferenz zu Abnahme der Lichtintensität.

Da der instrumentelle Aufbau einen senkrechten Lichteinfall (von unten auf die Probe) garantiert, muss kein linear polarisiertes Licht verwendet werden. Eine einfache Halogenlampe kann als Lichtquelle für weißes Licht fungieren.

Als Glassubstrate werden Glaschips aus Borosilikatglas D263 mit einer Dicke von ca. 1 mm benutzt. Da dünne Proteinfilme im Schichtdickenbereich von nur wenigen Nanometern nicht direkt mit der Wellenlänge von Weißlicht untersucht werden können, ist das Glassubstrat mit einer Interferenzschicht von 10 nm  $\text{Ta}_2\text{O}_5$  und 330 nm  $\text{SiO}_2$  beschichtet. Mit der Interferenzschicht wird der Brechungsindex des Glassubstrats an die Brechungsindizes der Analyten (Lipide, Proteine, Biomoleküle: ungefähre Brechungsindex  $n = 1.44$ ) angepasst<sup>[130, 135]</sup>. Große Differenzen in den Brechungsindizes würden Vielfachinterferenzen verursachen und die Messgenauigkeit erheblich einschränken<sup>[123]</sup>. Ebenso bildet das  $\text{Ta}_2\text{O}_5$  eine reflexionsverstärkende Schicht, es wirkt als teiltransparenter Spiegel und erhöht so ebenfalls die Messgenauigkeit<sup>[123]</sup>.

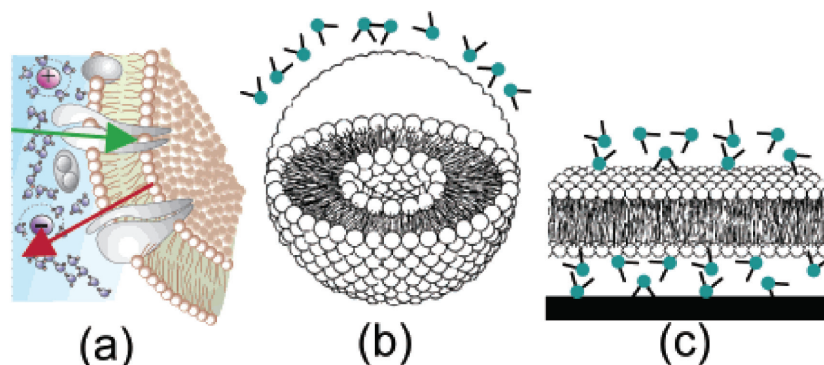
Die RfS bietet also eine gute Möglichkeit Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen in Echtzeit, ohne vorherige Modifizierungen an Rezeptor oder Ligand vornehmen zu müssen, analysieren zu können. Die Wechselwirkung zwischen, auf dem Glassubstrat immobilisierten, Rezeptor und in der Lösung vorliegenden Liganden (Analyten) führen zur Schichtdickenzunahme, die sofort detektiert werden kann. Die reflektometrische Interferenzspektroskopie stellt eine kostengünstige Alternative zur Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR) dar. Auch die hohe Empfindlichkeit und Messgenauigkeit liegt für beide optische Analysemethoden in ähnlichen Größenordnungen<sup>[136]</sup>.

## 1.4. Künstliche (Bio)Membranen – Lipiddoppelschichten (SLB) – auf Oberflächen durch Vesikelfusion

Biomembranen sind eine der wichtigsten Kompartimente eines Lebewesens und Phospholipiddoppelschichten dienen als ideale Modellsysteme für künstliche (Bio)-Membranen<sup>[137-139]</sup>. Gerade auch die Möglichkeit diese Lipiddoppelschichten, mit ihrer zweidimensionalen Fluidität<sup>[140]</sup>, auf Oberflächen fixieren zu können, sogenannte SLBs, und mit Hilfe von oberflächensensitiven Analysemethoden (wie in Abschnitt 1.2 und 1.3 beschrieben) untersuchen zu können, haben die Bedeutung von diesen Modellsystemen enorm gesteigert<sup>[141]</sup>.

Ein weiterer Vorteil besteht in der Möglichkeit, sie auch als Plattform einer natürlichen und für Proteine und andere biochemische Kompartimente (Antikörper, Hormone, Rezeptoren) inerten Umgebung (zellmembranähnlich) für Biosensoren und Biochips einsetzen zu können<sup>[118, 142-144]</sup>. Unspezifische Wechselwirkungen mit der hydrophilen Oberfläche können so unterbunden werden<sup>[145, 146]</sup>. Die Lipidschicht lässt sich mit Rezeptoren relativ einfach modifizieren, so dass auf diese Weise funktionalisierte Lipiddoppelschichten verwenden und untersucht werden können<sup>[147]</sup>.

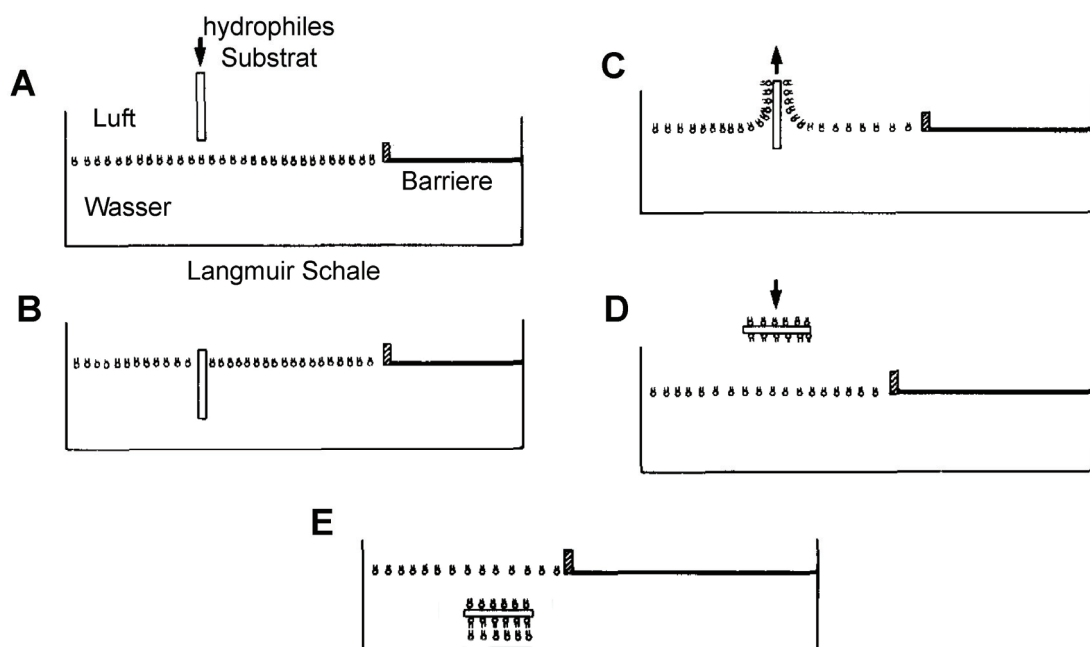
Als weiteres Modellsystem für Zellmembranen dienen Liposomen, die aber weitaus schwieriger zu untersuchen sind, da sie frei in Lösung beweglich sind und für oberflächensensitive Analysemethoden und optische Biosensoren so nicht zugänglich sind<sup>[118]</sup> (Abbildung 5).



**Abbildung 5:** (a) Zellmembran und die Modellsysteme (b) Liposomen und (c) planare SLB<sup>[138]</sup>.

Als erstes beobachtete die Gruppe von *P. Mueller et al.* 1962 die Stabilität von planaren, fluiden Lipiddoppelschichten auf Oberflächen<sup>[148]</sup>. Die erste physikalische Untersuchung solcher Systeme leisteten 1981 *V. von Tscharner* und *H. M. McConnell*<sup>[149]</sup>. Anschließend vervollständigten *L. K. Tamm* und *H. M. McConnell* im Jahr 1985 die begonnen Untersuchungen<sup>[150]</sup> und zeigten gleichzeitig, dass die Membranen auf festen Oberflächen mit den bis dahin schon wohl bekannten und sehr gut untersuchten Lipidmonolagen (SAMs) an der Luft-Wasser-Grenzfläche vergleichbare Eigenschaften aufweisen<sup>[150]</sup>.

Diese ersten Lipiddoppelschichten wurden alle über die Langmuir-Blodgett-(LB)-Technik auf Oberflächen aufgebracht, was nichts anderes bedeutet, als dass zwei Lipidmonoschichten von der Luft-Wasser-Grenzfläche (z. B.: von der Filmwaage) durch Eintauchen eines hydrophilen Substrats (z.B.: Glas, Silikon, Quarz) auf dieses übertragen werden (Abbildung 6)<sup>[150-153]</sup>. SAMs erhält man am einfachsten, indem in organischen Lösungsmitteln vorzugsweise Chloroform) gelöste (Phospho)Lipide vorsichtig auf die in einer Langmuir-Schale befindliche wässrige Unterlage getropft werden. Dabei bildet sich an der Luft-Wasser-Grenzphase, nach Verdampfen des organischen Lösungsmittels spontan eine Lipidmonoschicht (SAM) aus<sup>[154]</sup>.

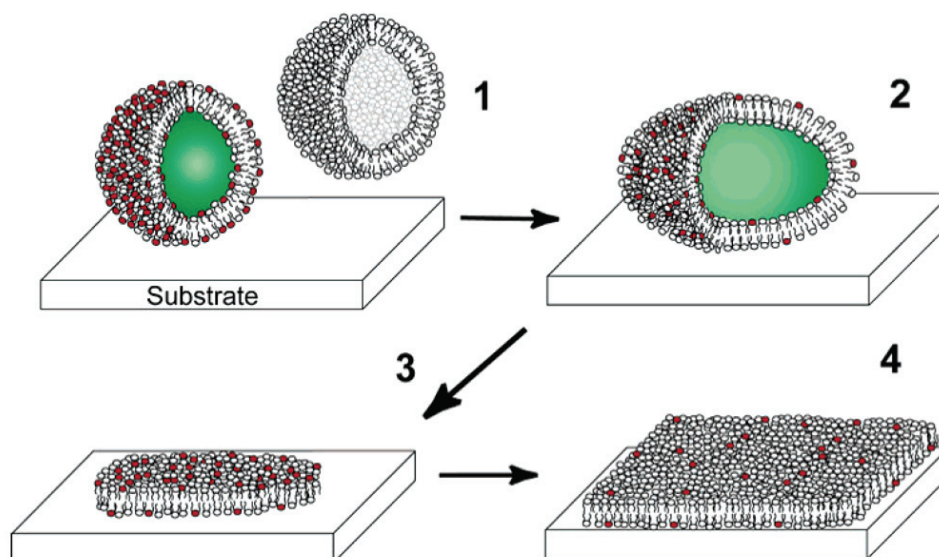


**Abbildung 6:** Langmuir-Blodgett-Technik zur Erstellung von Lipiddoppelschichten<sup>[118]</sup>.

Von ersten Lipiddoppelschichten auf Oberflächen mittels Vesikelfusion wurde 1984 und 1986 von *H. M. McConnell et al.* berichtet<sup>[118, 155, 156]</sup>. Heute zählt die Vesikelfusion zur einfachsten und bequemsten Methode, um SLBs in hoher Qualität<sup>[138, 153]</sup> und mit geringem Aufwand darzustellen<sup>[143]</sup>. Kleine Vesikel (Liposomen) können einfach, mittels Extrusion (100-200 nm große Vesikel (LUV))<sup>[157]</sup> oder Ultraschall<sup>[158]</sup> (25-100 nm große Vesikel (SUV))<sup>[139]</sup>, hergestellt werden. Die Bildung von Lipiddoppelschichten kann in zwei Schritte unterteilt werden, die Vesikeladsorption und anschließend die Vesikelfusion mit folgendem Aufplatzen<sup>[139]</sup>.

Kommen die Liposomen mit hydrophilen Oberflächen (z.B. Glas) in Kontakt, werden sie durch attraktive Vesikel-Oberflächen-Wechselwirkungen (Van-der-Waals-Wechselwirkungen<sup>[159]</sup>), die gegebenenfalls durch elektrostatische Wechselwirkungen verstärkt werden können, adsorbiert<sup>[160]</sup>. Einmal auf der Oberfläche adsorbiert, bleiben die Vesikel dort; die Vesikel-Oberflächen-Wechselwirkung ist irreversibel (Abbildung 7-1)<sup>[139]</sup>.

Die Adsorption von Vesikeln auf der Oberfläche nimmt bis zu einer kritischen Oberflächenbelegung weiter zu<sup>[138]</sup>. Wenn zwei Vesikel sich sehr nahe kommen, können diese zu größeren Vesikeln fusionieren (Vesikel-Vesikel-Wechselwirkungen)<sup>[143]</sup> und sich verformen (Abbildung 7-2). Die so instabilisierten Vesikel können aufbrechen und so eine Lipiddoppelschicht-Insel (Abbildung 7-3) bilden. Die Zwischenräume werden mit neuen Vesikeln aufgefüllt, die ebenfalls aufbrechen und so eine komplette Lipiddoppelschicht ausbilden (Abbildung 7-4).



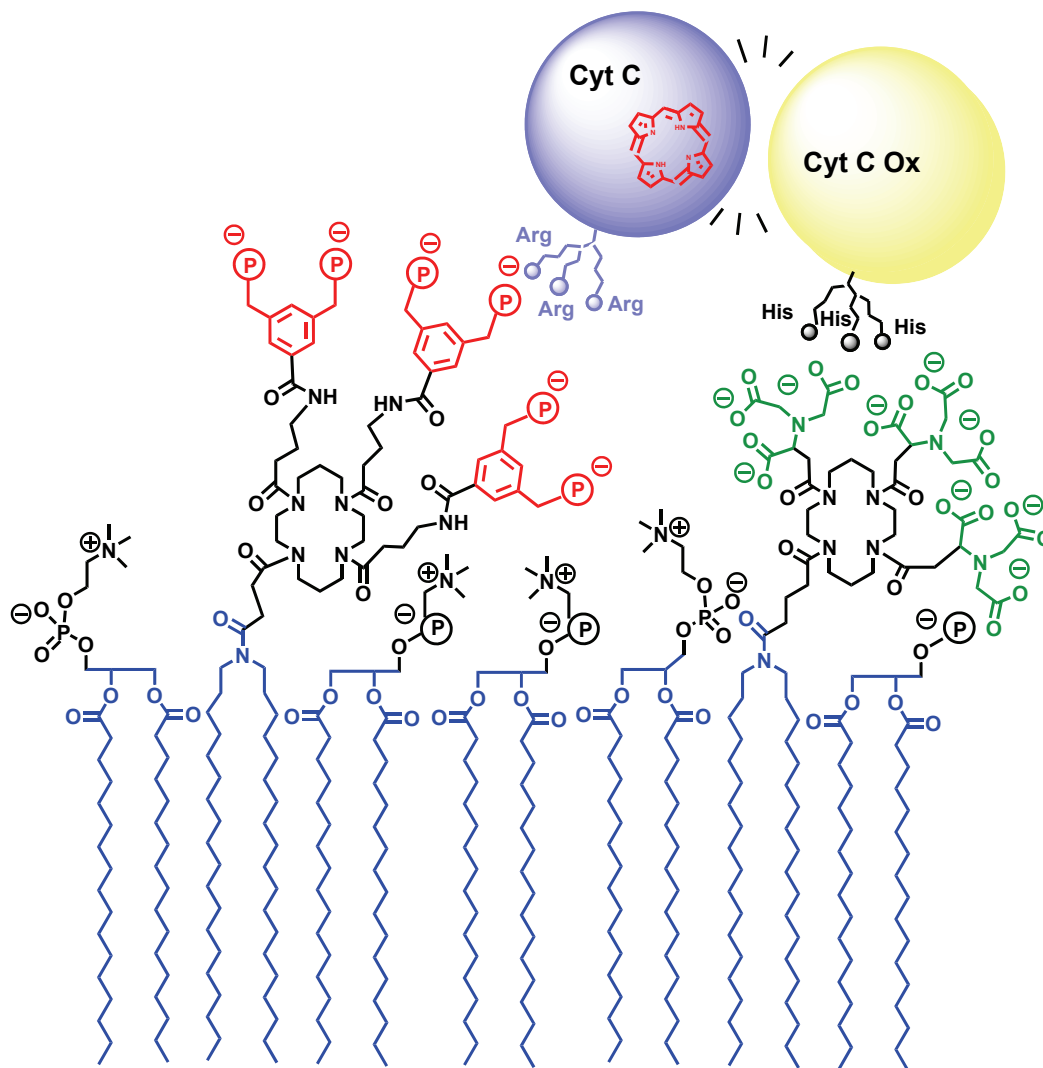
**Abbildung 7:** Vorgang der Vesikelfusion auf der Oberfläche nach S. G. Boxer<sup>[143]</sup>.

Um das Aufbrechen der Vesikel zu erleichtern und so die Doppelschichtbildung nochmals zu vereinfachen, besteht die Möglichkeit, die Vesikel osmotischem Stress auszusetzen, indem die Salzkonzentration im Umgebungsmedium, im Gegensatz zur Flüssigkeit in den Liposomen, erhöht wird<sup>[138]</sup>. Meist sind die Liposomen mit Puffer (150 mM NaCl) gefüllt. Vor der Vesikelspreitung auf der Oberfläche kann die Salzkonzentration auf 0.5 M bis 1 M NaCl erhöht werden, um den Effekt des osmotischen Stress auf die Vesikel optimal ausnutzen zu können. Durch die Konzentrationsunterschiede wird das Volumen der Vesikel verringert<sup>[138]</sup>. Die kritische Vesikelkonzentration auf der Oberfläche wird erniedrigt und so schneller erreicht. Die Doppelschichtbildung wird dadurch beschleunigt und vereinfacht<sup>[138]</sup>. In der Literatur wird zur Zeit noch diskutiert, ob die Fusion der Vesikel auf der Oberfläche zur Doppelschichtbildung zwingend erforderlich ist, oder der dominierende Weg zur SLB-Bildung ist<sup>[137]</sup>.

Da die Lipiddoppelschicht nicht, wie eigentlich anzunehmen, direkt auf der Oberfläche aufliegt, sondern durch einen ultradünnen Wasserfilm von ihr getrennt ist<sup>[150, 161, 162]</sup> (Abbildung 5 (c)), besitzen die Lipiddoppelschichten auf Oberflächen die gleichen strukturellen und thermodynamischen Eigenschaften, wie freie Lipidschichten (Liposomen, Zellmembranen, siehe Abbildung 5)<sup>[161]</sup>. Die dynamischen und strukturellen Eigenschaften von Lipidschichten auf Oberflächen haben jedoch den großen Vorteil, mittels oberflächenanalytischen optischen Verfahren untersucht werden zu können (RIfS, SPR, TIRF, Ellipsometrie)<sup>[161]</sup>.

## 2. Aufgabenstellung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollen Rezeptorlipide zur (irreversiblen) Immobilisierung von Arginin-getaggtten Proteinen, auf mit Lipiddoppelschichten modifizierten Oberflächen, synthetisiert werden. Diese Rezeptorlipide könnten das Potential haben mit dem analogen Rezeptor für Histidin-getaggte Proteine der Gruppen *R. Tampé* und *J. Piehler*, gemeinsam auf eine Lipiddoppelschicht eingelagert werden zu können, mit dem Fernziel einen Protein-Protein-Crosstalk auf der Oberfläche beobachten zu können.

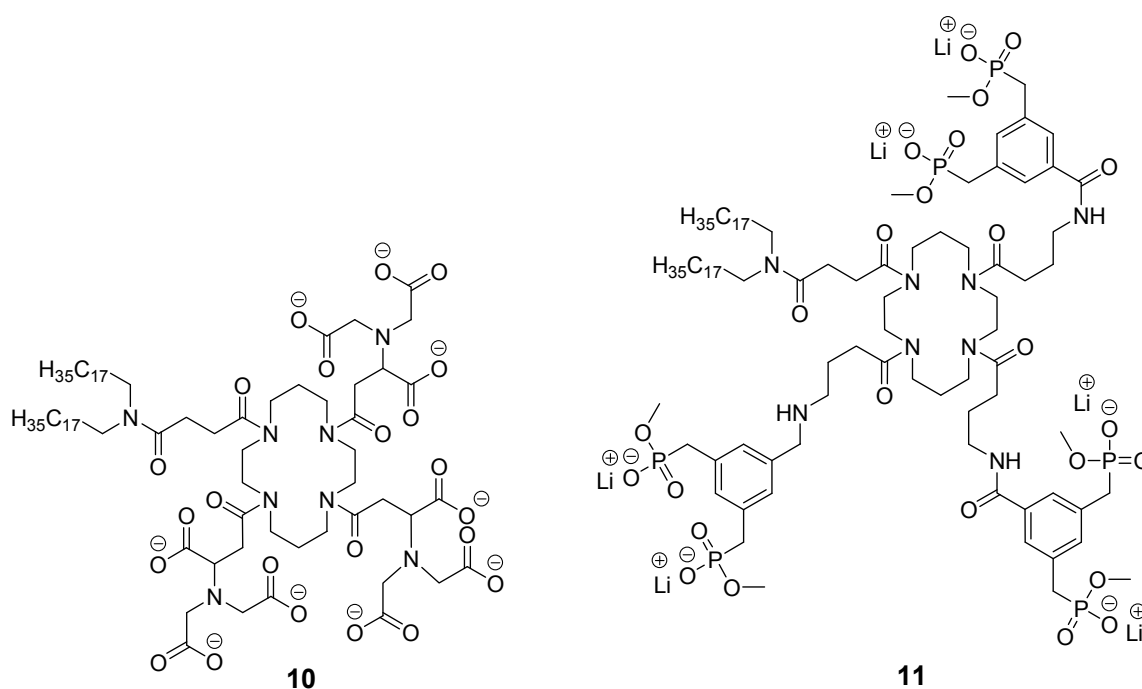


**Abbildung 8:** Immobilisierung von Arg- und His-getaggtten Proteinen auf einer Lipidoberfläche zur Beobachtung eines Protein-Protein-Crosstalks.

So könnten einerseits ein Histidin-getaggttes Protein und ein damit wechselwirkendes Arginin-getaggttes Protein andererseits, wie in Abbildung 8 gezeigt, immobilisiert werden und gegebenenfalls miteinander interagieren. Für die Beobachtung eines solch fundamentalen Ereignisses, sollen in dieser Arbeit, mit der Synthese und Untersuchung der Rezeptorlipide, erste Grundsteine gelegt werden.

Desweiteren können auf Oberflächen immobilisierte Proteine ihren funktionalen Zustand erhalten. Dies gilt insbesondere für mit einem „Tag“ versehene Proteine. Die Bindung an Rezeptoren, die in eine lipidischen Oberfläche eingelagert sind, mittels eines Tags beeinflusst die Bioaktivität der Enzyme meist nicht, da sie sich nicht in der Nähe des aktiven Zentrums befinden und dieses so nicht durch eine Bindung verdecken, wie es ein Problem bei der Bindung an der Proteinoberfläche darstellen kann. Diese Art der Immobilisierung bietet die Möglichkeit, so auf der Oberfläche gebundene Proteine, wie bereits in der Einleitung erwähnt, in funktionsfähigem Zustand auf einer festen Oberfläche fixiert untersuchen zu können, um so Katalysezyklen aufzuklären, oder die Protein-Arrays für biologische Sensoren in der pharmazeutischen Forschung oder der Nanodiagnostik einzusetzen.

In Anlehnung an das *Tris*-NTA-Fluo **7** kann von der Gruppe *J. Piehler* das *Tris*-NTA-DODA **10** synthetisiert werden. Als analoges Rezeptorlipid soll in dieser Arbeit das Cyclam-basierte *Tris*-Bisphosphonat-DODA **11** dargestellt werden.

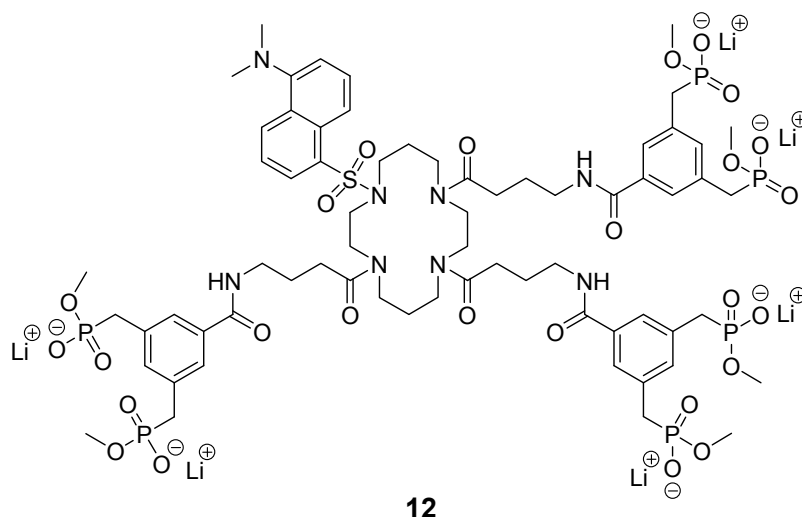


Wie schon in der Einleitung erwähnt, wurde das Bisphosphonat-Bindungsmotiv **1** in der Gruppe von *T. Schrader* bereits erfolgreich zur Bindung der Aminosäuren Arginin und Lysin und zur Bindung von basischen Proteinen (an der Proteinoberfläche) eingesetzt<sup>[16, 65, 66, 163]</sup>. Da die Bindung eines BP's in wässrigen Systemen und speziell in gepufferten Systemen mit physiologischer Salzkonzentration (150 mM NaCl) sehr gering ist, muss die Anzahl der Bindungsmotive pro Rezeptormolekül vergrößert werden (Multivalenz). Von *C. Renner* wurde der Versuch einer Multiplizierung der Rezeptoren mittels statistischer Polymerisation erfolgreich durchgeführt und eine Erhöhung der Bindungseigenschaften erreicht<sup>[16]</sup>. Diese Polymere **3** wurden auch zur Bindung von Proteinen auf Oberflächen eingesetzt, wobei diese Polymere die Proteine nicht in ausgerichteter Orientierung, sondern nur zufällig orientiert auf der Oberfläche binden konnten.

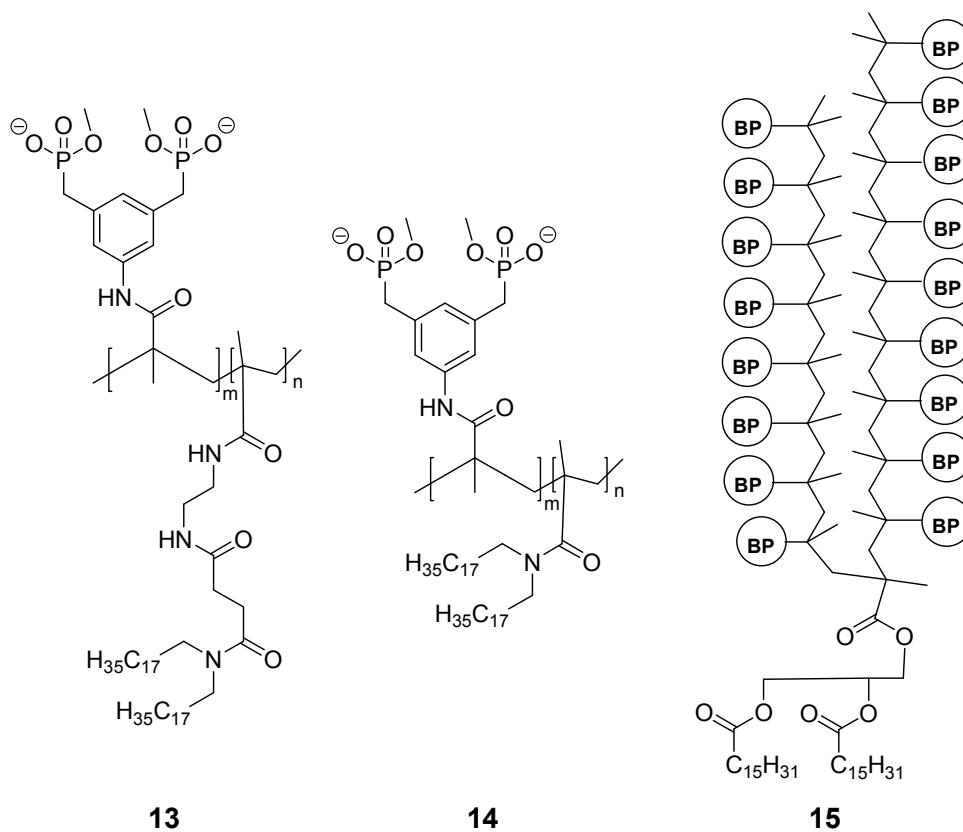
Eine bestmögliche Vororientierung der Proteine auf der Oberfläche soll mit dem neuen Rezeptorlipid **11** ermöglicht werden, damit die Proteine, insbesondere solche mit Arginin-Tag, in funktionaler Form auf der Oberfläche immobilisiert werden können. Dazu muss das Rezeptorlipid **11** auf seine Einlagerungsfähigkeit in Lipiddoppelschichten und seine Bindungseigenschaften hin untersucht werden. Dabei soll das Augenmerk insbesondere auf die Bindungseigenschaften des Rezeptors für basische und mit Arginin-Tag versehene Proteine gerichtet werden und insbesondere die Bindungseigenschaften auf der lipidischen Oberfläche mittels reflektometrischer Interferenzspektroskopie untersucht werden, welche dafür im Arbeitskreis etabliert werden muss.

Die Einlagerungsfähigkeit des Rezeptors **11** in Lipidschichten kann in ersten grundlegenden Versuchen mit der Filmwaagetechnik an der Luft-Wasser-Grenzfläche analysiert werden. Auch erste Bindungsstudien können an der Luft-Wasser-Grenzfläche in SAMs aus Stearinsäure untersucht werden. Desweiteren sollen auch die Bindungseigenschaften in Lösung studiert werden, weswegen ein zu **11** analoger Rezeptor mit Fluoreszenzmarkierung **12** synthetisiert werden soll.

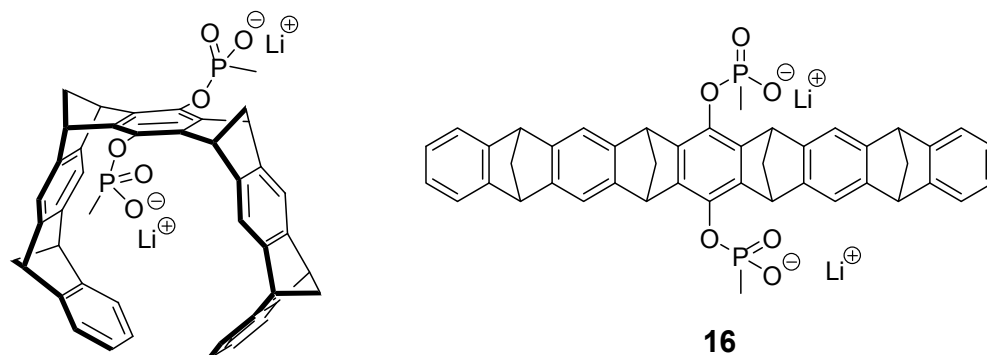




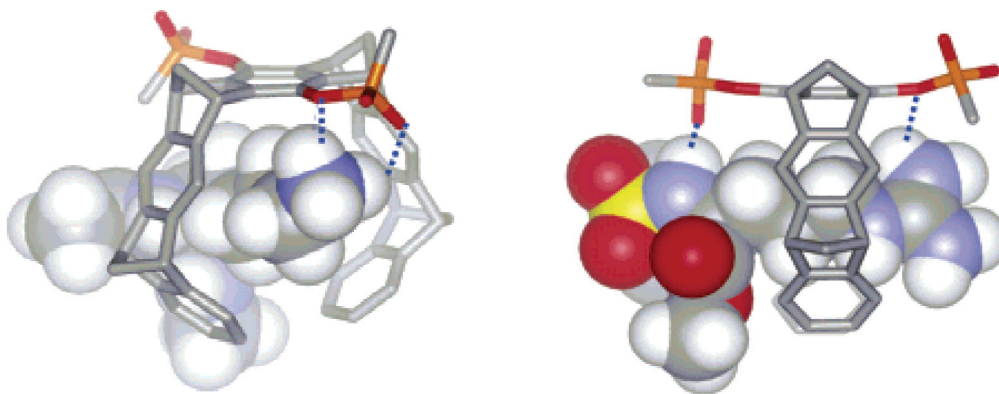
Eine weitere Möglichkeit zur Steigerung der Anzahl der Bindungsmotive bietet die bereits von *C. Renner* ausgenutzte Möglichkeit der Polymerisierung. Es soll versucht werden, die mit einem Lipidanker versehenen Polymere **13**, **14** und **15** darzustellen und diese dann in eine Lipidoberfläche einzulagern und die Eigenschaften mit dem Rezeptorlipid **11** zu vergleichen.



Ein weiteres Bindungsmotiv für die basischen Aminosäuren Arginin und Lysin ist die Bisphosphonat-Benzen-Spacer-Pinzette **16**, welche in Zusammenarbeit der Gruppen *F.-G. Klärner* und *T. Schrader* von *M. Fokkens* synthetisiert wurde<sup>[164]</sup>.



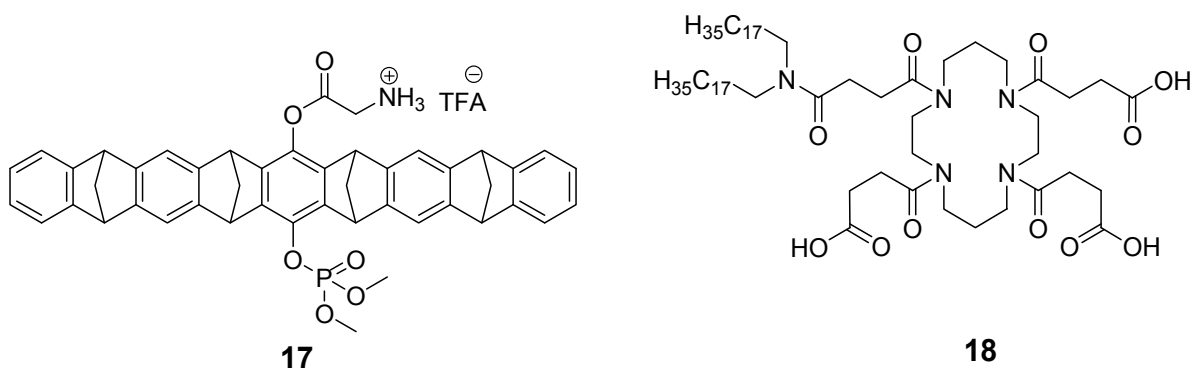
Die Bisphosphonatpinzette **16** ist das bis heute stärkste Bindungsmotiv für die Aminosäure Lysin in wässriger gepufferter Lösung (25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) mit einer  $K_a = 4400 \text{ M}^{-1}$  für Ac-Lys-OMe. Für Arginin (Ts-Arg-OEt) liegt die Bindungsstärke mit einer  $K_a = 1800 \text{ M}^{-1}$  etwa um die Hälfte niedriger als für Lysin<sup>[164]</sup>.



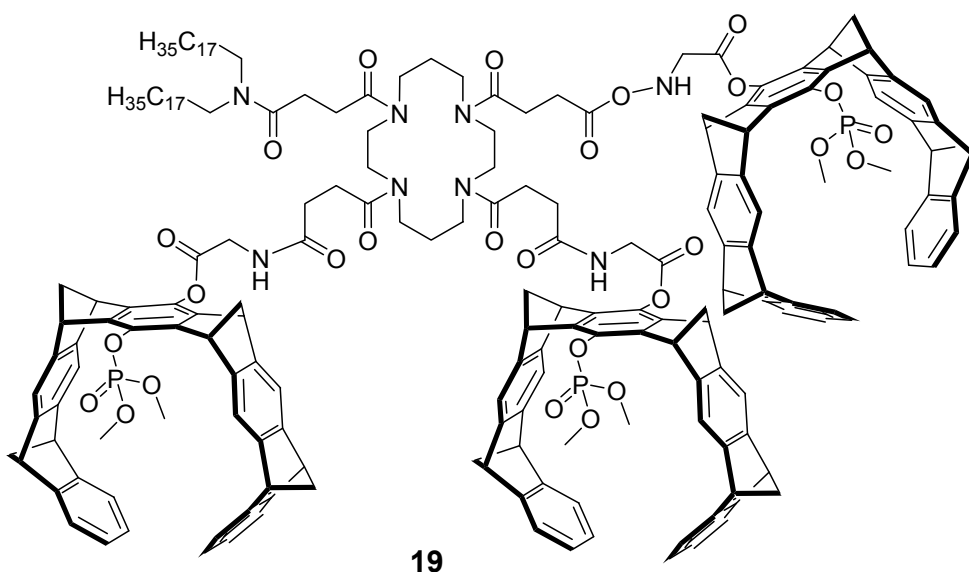
**Abbildung 9:** Monte-Carlo-Simulation der Komplexe zwischen der Pinzette **16** und Ac-Lys-OMe (links) und **16** mit Ts-Arg-OEt (rechts) (MacroModel 7.1, Amber\*, Wasser, 5000 Schritte<sup>[164]</sup>).

Die negative Kavität der Pinzette umschließt die Alkylgruppen der Aminosäure und die positiv geladene Ammonium-Gruppe bzw. Guanidinium-Gruppe schaut aus der Kavität heraus und wird vom negativ geladenen Phosphonat elektrostatisch gebunden, wie in Abbildung 9 gezeigt<sup>[164]</sup>.

Dieses Bindungsmotiv soll ebenfalls wieder aufgegriffen und so angepasst werden, dass das Bisphosphonat **1** durch die Benzen-Bisphosphonatpinzette **16** in Rezeptorlipid **11** ersetzt werden kann. Dazu muss die Pinzette **16** unsymmetrisch substituiert werden, wobei das Phosphonat vorzugsweise durch ein Phosphat ersetzt werden soll, wie die unsymmetrische Phosphat-Glycinammonium-Pinzette **17** zeigt.



Diese Pinzette soll anschließend an das ebenfalls modifizierte Cyclamgrundgerüst **18** gekuppelt werden, um Molekül **19** zu erhalten. Dieses Molekül sollte Proteine mit Arginin- oder Lysin-Tag sehr effektiv auf der Oberfläche immobilisieren können.

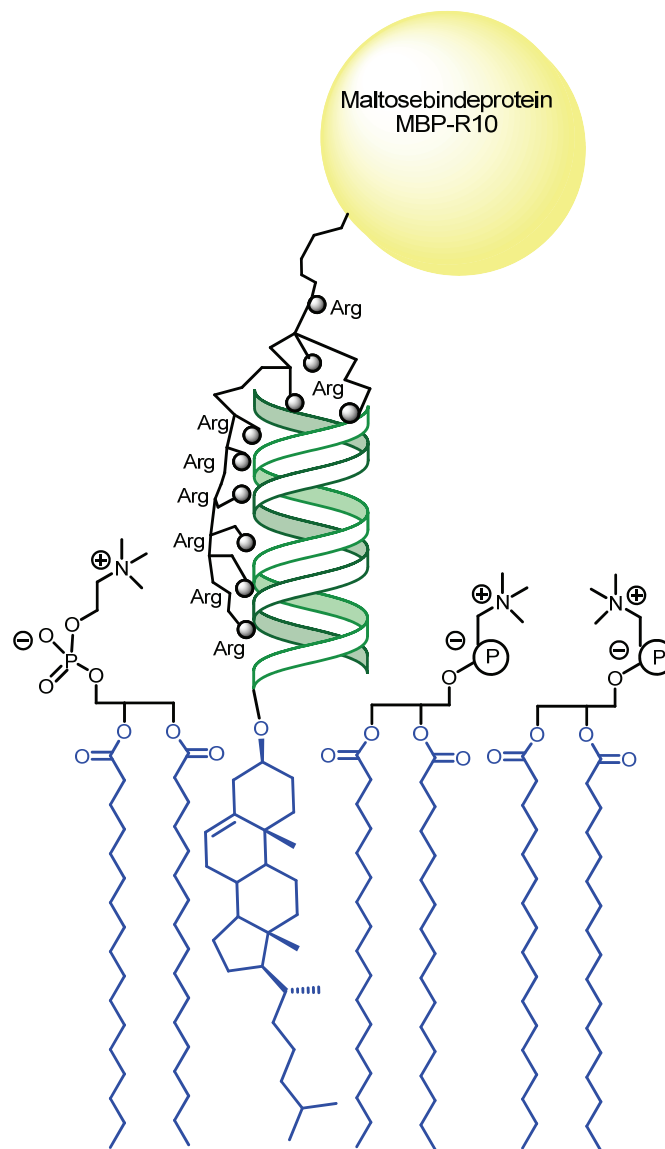


Anschließend soll entschieden werden, ob pro Pinzette eine Methoxygruppe (3 negative Ladungen) gespalten wird, oder ob beide Methoxygruppen gespalten (6 negative Ladungen) werden sollen/können.

Seit langer Zeit ist bereits bekannt, dass die basischen Aminosäuren Arginin und Lysin mit ihren positiven Ladungen eine hohe Bindungsaffinität zu doppelsträngiger DNA haben<sup>[165]</sup>. Dabei weist Arginin eine noch größere Bindungsstärke zur DNA auf, als Lysin, da die Guanidinium-Gruppe mehr Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden kann, als die Ammoniumgruppe des Lysins<sup>[166]</sup>. Das Guanidinium-Kation bindet einerseits am negativ geladenen Phosphatrückgrat, andererseits aber auch die DNA-Basen in der großen und kleinen Furche der DNA<sup>[167]</sup>.

Alle Gruppen der DNA-Bindungsproteine, wie Histone, Zinkfinger-Proteine oder Transkriptionsfaktoren weisen daher eine große Anzahl von Argininen auf der Proteinoberfläche auf. Wie das Transkriptions-Aktivator-Protein (Tat) des HI-Virus-1 mit seiner hochbasischen Sequenz, bestehend aus neun Aminosäuren (davon sechs Arginin und zwei Lysin) zeigt, besitzt dieses Motiv eine hohe Bindungsaffinität zu doppelsträngiger DNA<sup>[168, 169]</sup>.

So sollte ein Arginin-Tag, bestehend aus einem kurzen Arginin-Peptid auch eine große Bindungsaffinität zu doppelsträngiger DNA aufweisen<sup>[168]</sup>. Aus diesem Grund soll auch in dieser Arbeit versucht werden, basische und Arginin-getaggte Proteine mittels kurzer DNA-Stränge auf Lipiddoppelschichten zu immobilisieren. Dazu muss ein DNA-Einzelstrang mit einem Lipidanker (Cholesterol) versehen werden und anschließend mit einem komplementären Strang zu einem Doppelstrang hybridisiert werden. Auf diese Weise sollten mit DNA dotierte Lipiddoppelschichten zu erhalten sein, auf denen Proteine immobilisiert werden können (Abbildung 10).



**Abbildung 10:** Mit 3'-Cholesterol modifizierter ds-DNA-Strang (Chol-ds-DNA) dotierte Lipidschicht zur Bindung von basischen und Arginin-getaggtten Proteinen.

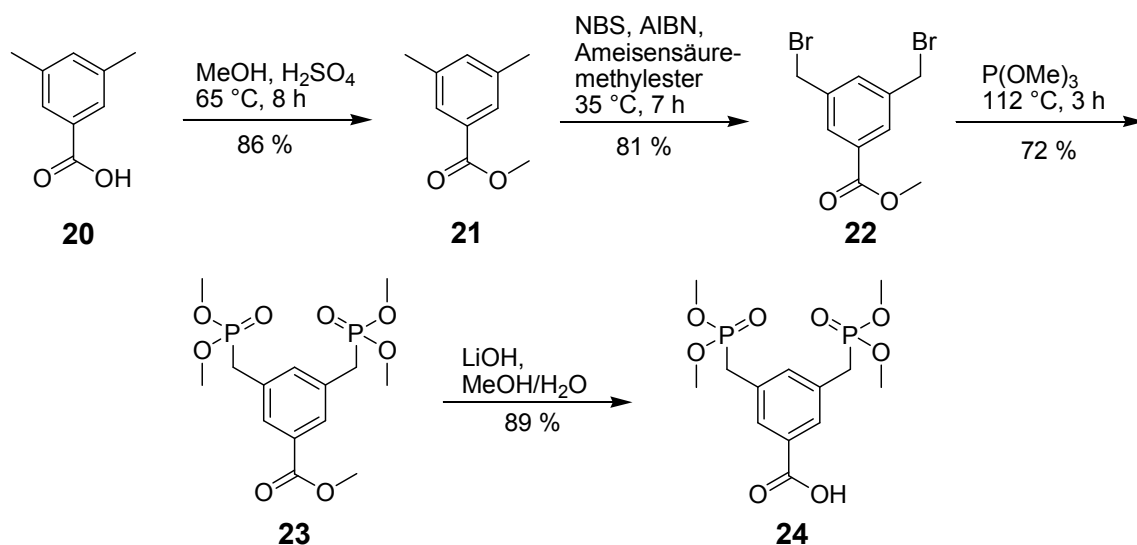
### 3. Durchführung und Ergebnisse

#### 3.1. Synthesen

##### 3.1.1. Synthese des Cyclam-basierten BP-Rezeptorlipid 11

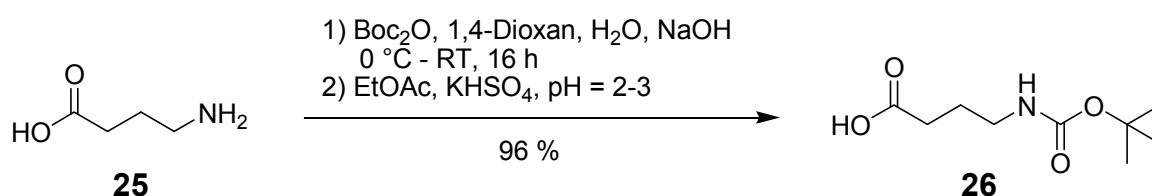
Als Erkennungseinheit (Rezeptoreinheit) für basische Aminosäuren kann das von *T. Schrader* entwickelte Bisphosphonat-Bindungsmotiv (*m*-Xylylenbisphosphonat-pinzette) eingesetzt werden<sup>[65, 170, 171]</sup>. Dieses ist mit einer Carbonsäurefunktion in der 1-Position zugänglich, womit es später an das makrocyclische Cyclamgrundgerüst gekoppelt werden kann.

Das Bisphosphonat-Benzoesäurederivat **24** ist ausgehend von 3,5-Dimethylbenzoesäure **20** in vier Stufen leicht zugänglich. Dazu wird die Benzoesäure zuerst mit Methanol verestert. Die Methylgruppen in 3- und 5-Position werden über eine radikalische Bromierung mit NBS/AIBN zu **22** bromiert. Die Phosphonestergruppen werden mittels Michaelis-Arbuzov-Reaktion mit Trimethylphosphit eingeführt. Die anschließende Methylesterspaltung mit LiOH liefert die Rezeptoreinheit **24**.



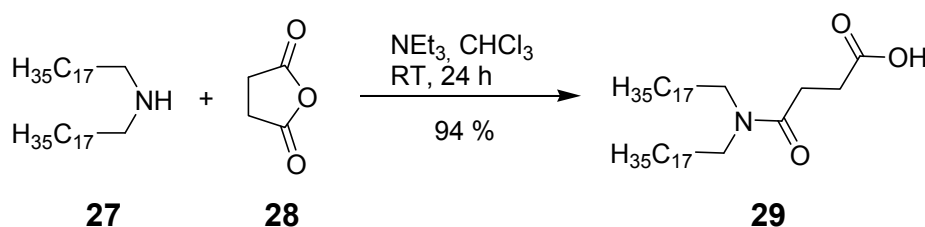
**Abbildung 11:** Synthese des Bisphosphonat-Benzoesäure Bindungsmotivs **24**.

Um den Bisphosphonat-Rezeptor **24** dreimal an das Cyclamgerüst koppeln zu können, muss dieses zuerst mit Spacern versehen werden. Dafür wird Boc-geschützte  $\gamma$ -Aminobuttersäure **26** benutzt, die aus  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) **25** mittels einer literaturbekannten Boc-Schützung gut zugänglich ist<sup>[172]</sup>.



**Abbildung 12:** Synthese der Boc-geschützten  $\gamma$ -Aminobuttersäure **26**.

Neben dem GABA-Boc-Spacer **26** wird noch der Lipidanker benötigt, der den Cyclam-Makrocyclus mit den drei Rezeptoreinheiten später in der Lipidschicht verankern soll. Dieser ist ebenfalls leicht in einer Stufe nach einer literaturbekannten Synthese zugänglich<sup>[72]</sup>. Dazu wird *N,N*-Dioctadecylamin **27** mit Bernsteinsäureanhydrid **28** zum Amid (DODA-Suc) **29** gekuppelt.



**Abbildung 13:** Synthese des Lipidankers Bernsteinsäure-*N,N*-dioctadecylamid **29** (DODA-Suc).

In einer darauf folgenden fünfstufigen Synthese kommt man zum Rezeptorlipid **11**. Im ersten Schritt werden drei Äquivalente Gaba-Boc **26** mit dem Kupplungsreagenz TBTU an drei der vier sekundären Amin-Stickstoffatome des Cyclams **30** gekuppelt. Dieses 3-fach substituierte Cyclam **31** ist gut zugänglich. Die Nebenprodukte (zweifach- und vierfachsubstituiertes Cyclam treten nur in sehr geringem Umfang auf) lassen sich gut mittels Säulenchromatographie abtrennen. An das noch freie sekundäre Amin-Stickstoffatom des Cyclams wird in der nächsten Stufe der Lipidanker **29**, ebenfalls mit TBTU, gekuppelt. Nach Abspaltung der Boc-

Schutzgruppen mit TFA kann der Schlüsselschritt dieser Syntheseroute, die Verknüpfung der Bisphosphonat-Rezeptoreinheiten **24** mit dem Cyclamgerüst **33**, erfolgen. Die Kupplung des Bisphosphonat-Benzoesäurederivats **24** mit **33** gelang mittels HOBt und EDCI.

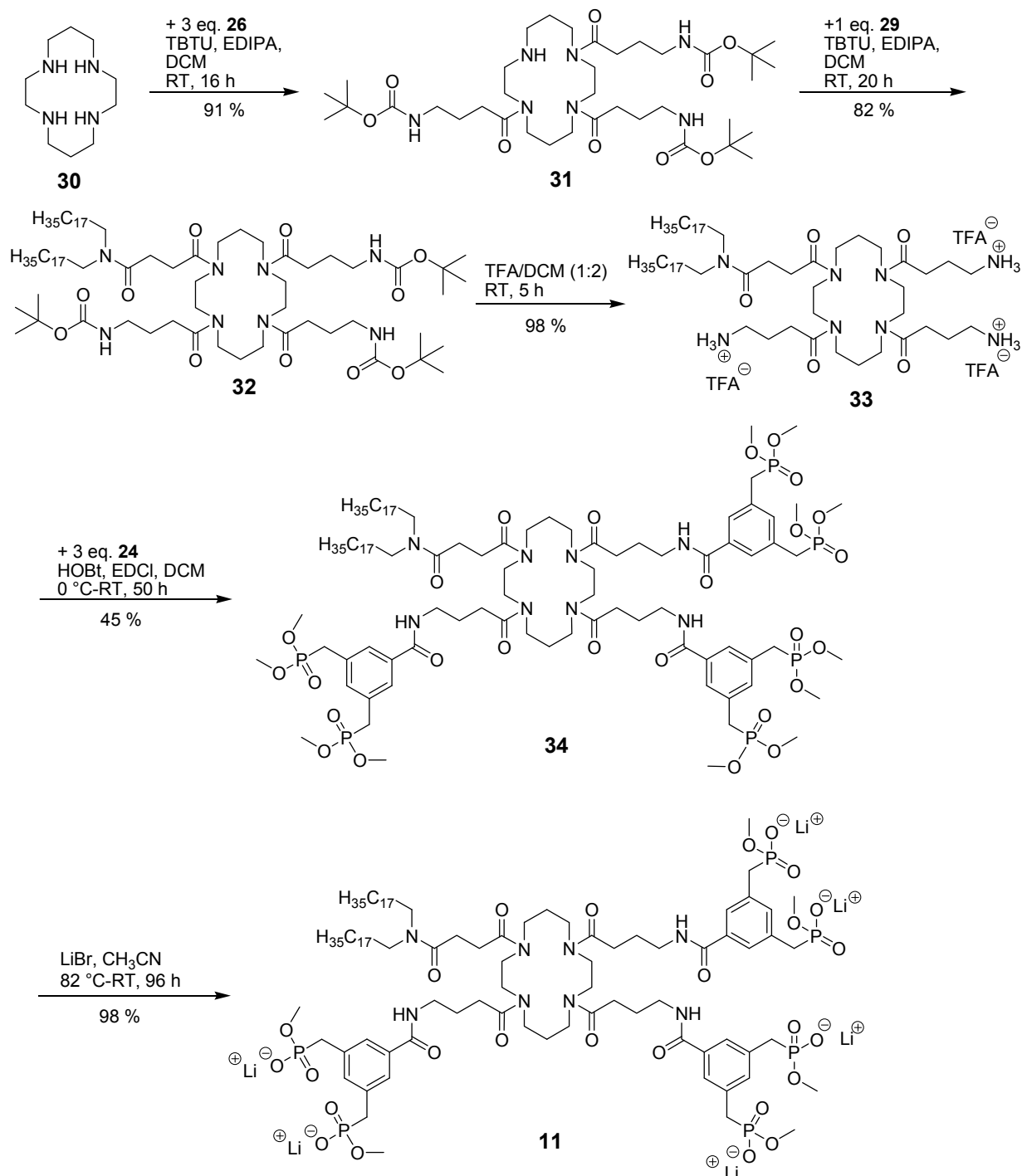
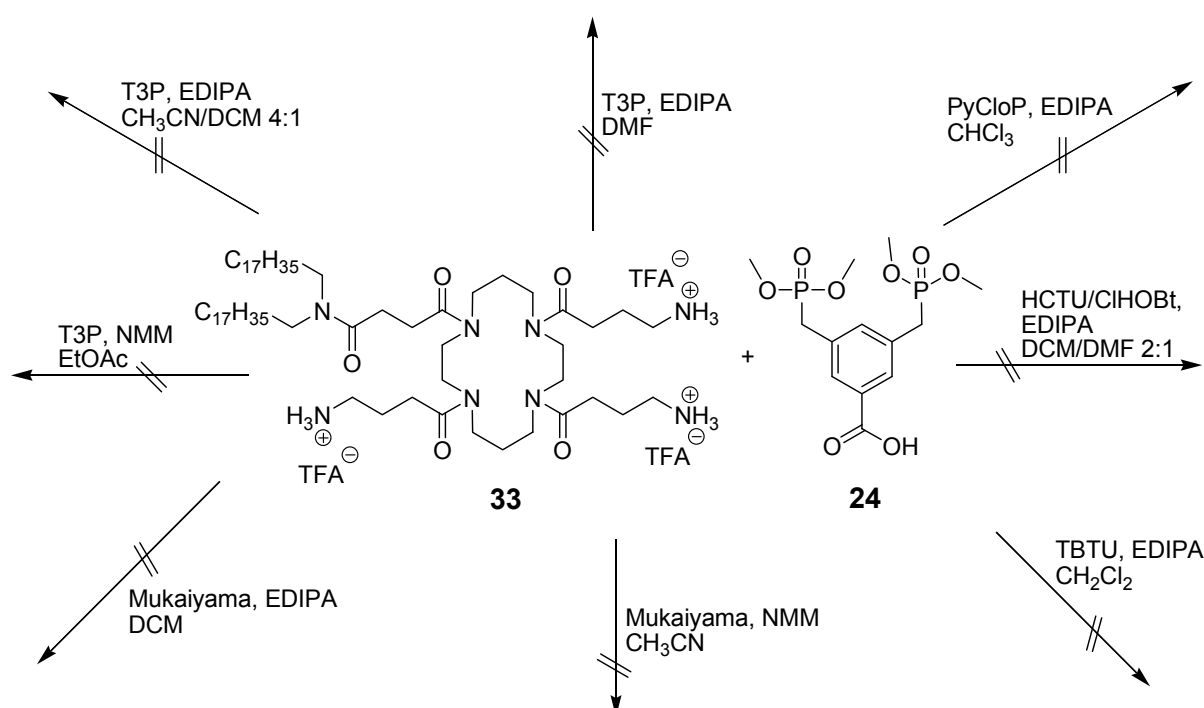


Abbildung 14: Darstellung des Rezeptorlipids **11**.



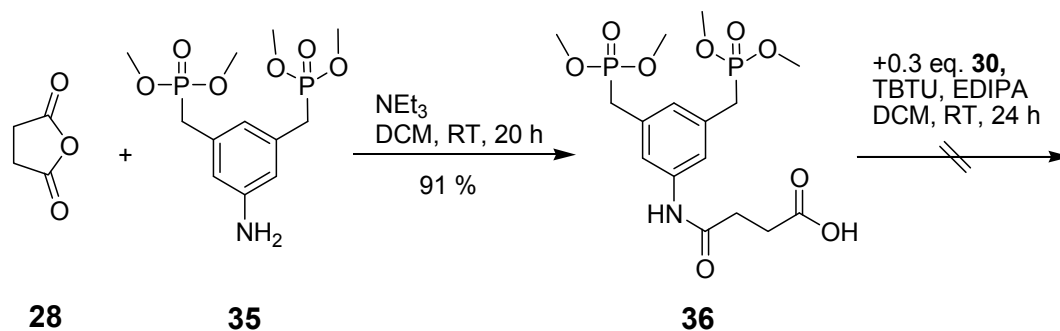
Im letzten Schritt findet die Spaltung der Phosphonsäuredimethylester mittels LiBr in Acetonitril zu Phosphonsäuremonomethylestern statt, womit der wasserlösliche Rezeptor **11** erhalten wird (Abbildung 14).

Große Probleme in der Synthese traten bei der Kupplung von **24** an das TFA-Salz **33** auf. Wie in Abbildung 15 gezeigt, wurden unterschiedliche Lösungsmittel, Hilfsbasen und Kupplungsreagenzien (T3P, HCTU, PyCLOP, Mukaiyama) für die Reaktion probiert, die alle nicht zum Erfolg, und damit zum Erhalt des Moleküls **34** führten.



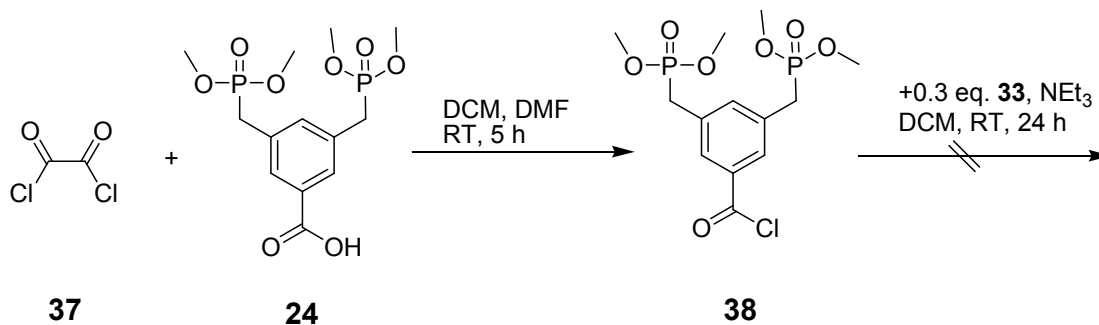
**Abbildung 15:** Verschiedene erfolglose Kupplungsbedingungen, die nicht zum Molekül **34** führten.

Auch der Versuch das BP-Anilinderivat **35** mit Bernsteinsäureanhydrid **28** zu kuppeln und anschließend dreimal mit TBTU und EDIPA an das Cyclam zu kuppeln führte für diese Stufe nicht zum Erfolg (Abbildung 16).



**Abbildung 16:** Erfolgreicher Kupplungsversuch ausgehend vom BP-Anilinderivat **35**

Da bis zu diesem Zeitpunkt alle milden Kupplungsreaktionen nicht zum Erhalt des Moleküls **34** geführt haben, stellte der Weg über das Benzoessäuresäurechlorid **38**, welches mit Oxalylchlorid **37** *in situ* erzeugt wurde und direkt mit **33** umgesetzt werden sollte, einen weiteren Versuch dar, die BP-Rezeptoreinheiten mit dem Cyclamgerüst **33** zu verknüpfen. Auch diese drastischen Bedingungen führten hier nicht zum Erfolg (Abbildung 17).

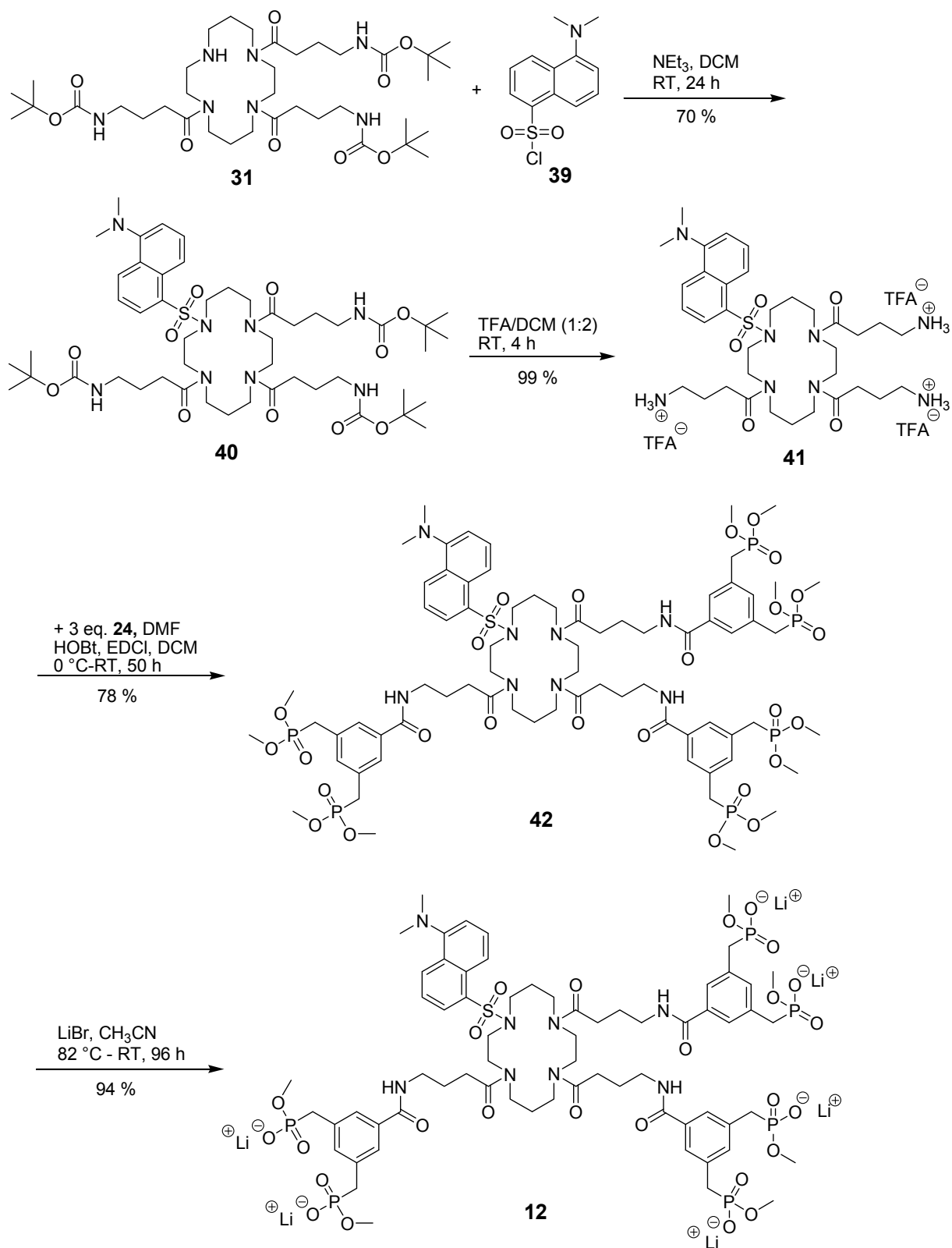


**Abbildung 17:** Erfolgreicher Kupplungsversuch über das Benzoessäurechlorid-Derivat **38**.

Der einzige Weg zum Molekül **34** lieferte erstaunlicherweise das eigentlich sehr schwache Kupplungsreagenz EDCI, in Kombination mit HOBt, wie im Reaktionsschema, Abbildung 14, gezeigt.

### 3.1.2. Synthese des Cyclam-basierten BP-Fluoreszenzrezeptors **12**

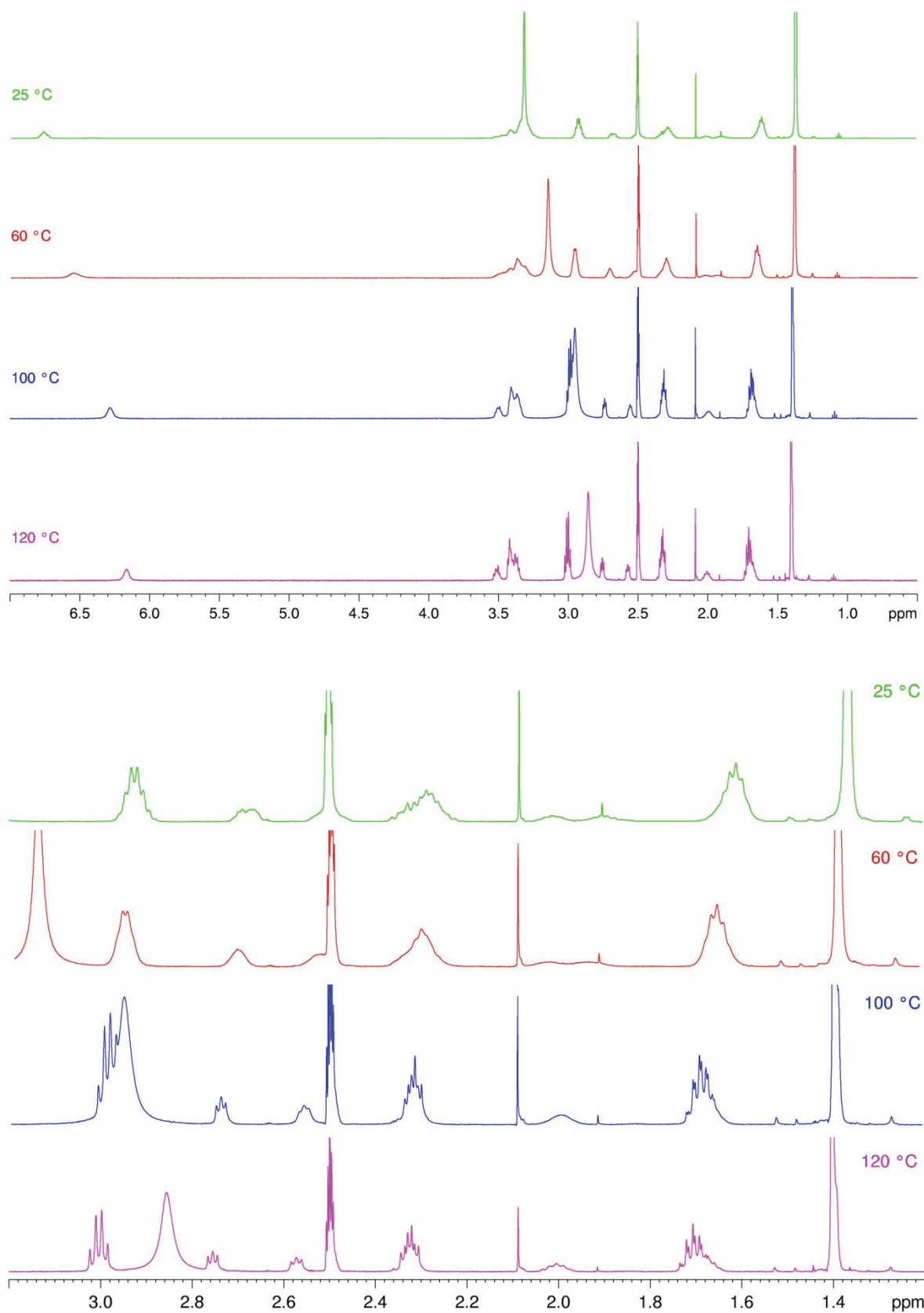
Als weiteres Molekül sollte in dieser Arbeit ein zu **11** analoger Rezeptor für Untersuchungen in Lösung dargestellt werden. Dieser Rezeptor **12** soll anstelle eines Lipidankers eine Fluoreszenzmarkierung tragen, um damit später Fluoreszenztitrationsen in Lösung durchführen zu können. So ist die Synthese für dieses Molekül ähnlich der zum Rezeptorlipid **11**. Ausgehend von dreifach mit Gaba-Boc substituierten Cyclam **31**, wird das noch freie sekundäre Amin mit Dansylchlorid gekuppelt. Nach der folgenden Abspaltung der Boc-Schutzgruppen folgt die Kupplung der BP-Einheiten **24** mit EDCI/HOBt. Die abschließende milde Spaltung der Phosphonsäuremethylester mit LiBr in Acetonitril führt zum wasserlöslichen Rezeptor **12** (Abbildung 18).



**Abbildung 18:** Syntheseweg zum wasserlöslichen fluoreszenzmarkierten Dansylrezeptor **12**.

Während der Synthesen war es sehr auffällig, dass sowohl die  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren, als auch die  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren der Verbindungen **11**, **12**, **31-34** und **40-42** sehr breite Signale aufweisen, die bei erhöhten Temperaturen scharf werden (Abbildung 19).

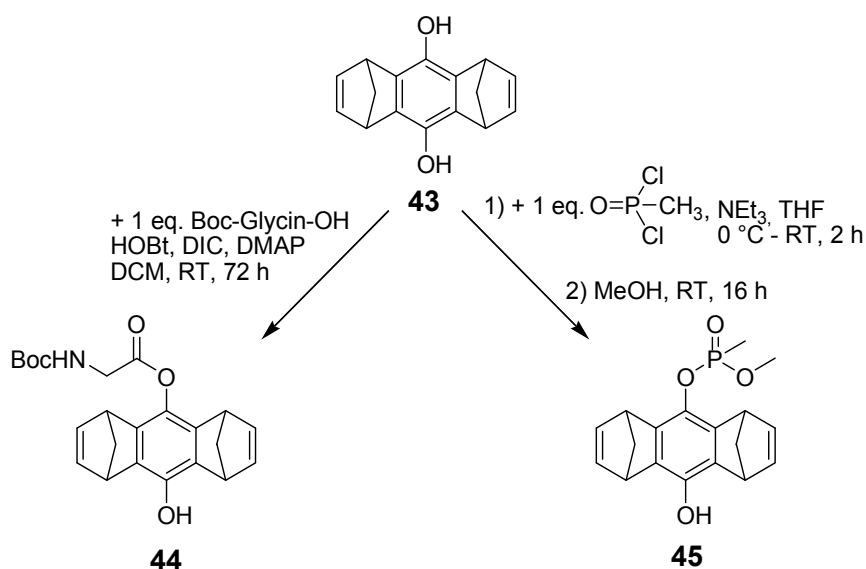
Unsubstituiertes Cyclam **30** hingegen ergibt auch bei RT in  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren scharfe Signale. Auch Cyclamderivate, welche an Methylengruppen substituiert sind, oder aber nicht als Amide funktionalisiert wurden, sondern als tertiäre Amine, ergeben scharfe Signale<sup>[173-176]</sup>. Solche Moleküle können mit den freien Elektronenpaaren an den Stickstoffatomen intramolekulare Wasserstoffbrücken bilden, so dass diese fixierte Strukturen ausbilden können, wodurch die NMR-Signale scharf bleiben. Durch Protonierung oder Amidbildung verschwindet diese Eigenschaft der Strukturfixierung mittels Wasserstoffbrückenbindungen. Das Molekül wird beweglich und kann langsam seine Konformation ändern und hin und her „klappen“. Dadurch verändert sich die Umgebung der Protonen kontinuierlich und die Signale werden breit. Bei höherer Temperatur nimmt die Beweglichkeit des Makrocyclus zu und die Bewegung wird beschleunigt, wodurch im Mittel die chemische Umgebung der einzelnen Protonen gleich bleibt, was in scharfen NMR-Signalen resultiert.



**Abbildung 19:** Oben:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren von **31** in  $\text{DMSO-d}_6$  bei verschiedenen Temperaturen (25 °C (RT), 60 °C, 100 °C und 120 °C). Unten: Vergrößerter Ausschnitt von 1.0 bis 3.5 ppm des oberen Spektrums.

### 3.1.3. Synthese von Modellverbindungen für die Pinzette, Synthese der unsymmetrischen Pinzette 17 und Synthese des Rezeptors 19

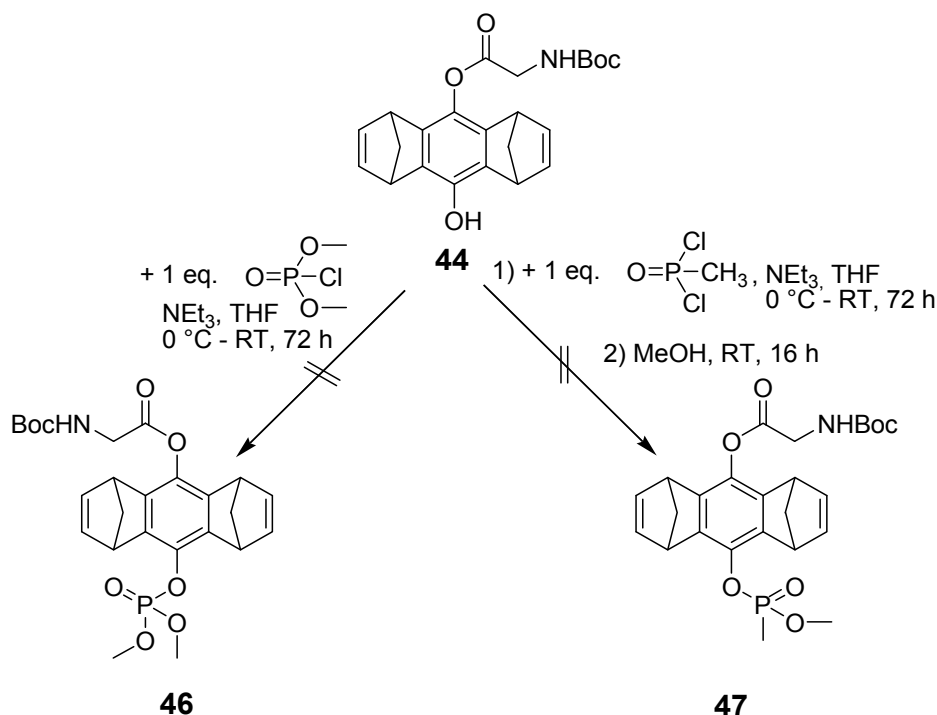
Des Weiteren wurde in dieser Arbeit eine unsymmetrisch substituierte Phosphat-Pinzette dargestellt. Um die Synthesewege zum Erhalt dieser Pinzette auszutesten, wurden einzelne Reaktionen zunächst an einer Modellverbindung, dem Hydrochinonspacer **43** getestet, da dieser in größeren Mengen leicht zugänglich ist. Es gelang ausgehend von **43** gezielt nur eine Hydroxygruppe mit der Boc-geschützten Aminosäure Glycin (Boc-Glycin-OH) zu verestern, um Molekül **44** zu erhalten. Analog gelang es ebenso den Mono-Phosphonatester **45** mit einem Äquivalent Methylphosphonsäuredichlorid und anschließender Alkoholyse mit Methanol zu erhalten (Abbildung 20).



**Abbildung 20:** Erfolgreiche Synthesen zu den unsymmetrischen, monosubstituierten Mono-Hydroxyspacereinheiten **44** und **45**.

Die weitere Umsetzung von **44** zum unsymmetrisch substituierten Mono-Glycin-Mono-Phosphat **46** mit Dimethylchlorophosphat blieb ebenso erfolglos, wie die Umsetzung von **44** mit Methylphosphonsäuredichlorid und Methanol zum Mono-

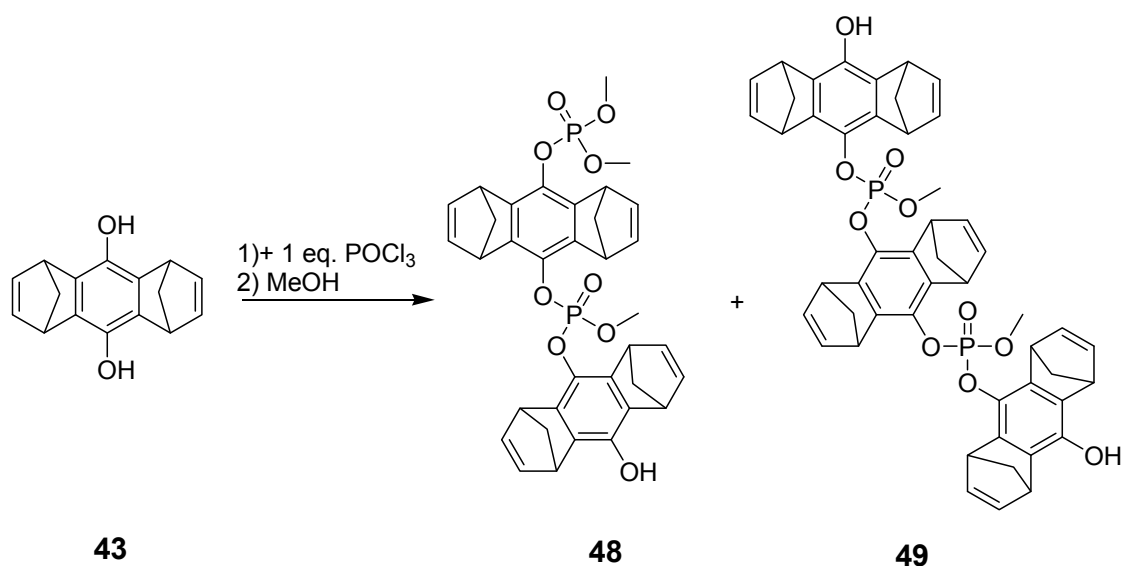
Glycin-Mono-Phosphonat **47**. Es wurde Edukt **44** zurückerhalten, oder aber das gewünschte Produkt war nur in Spuren nachweisbar (Abbildung 21).



**Abbildung 21:** Vergebliche Syntheseveruche zur unsymmetrischen Phosphat- **46** und Phosphonat-Spacereinheit **47**.

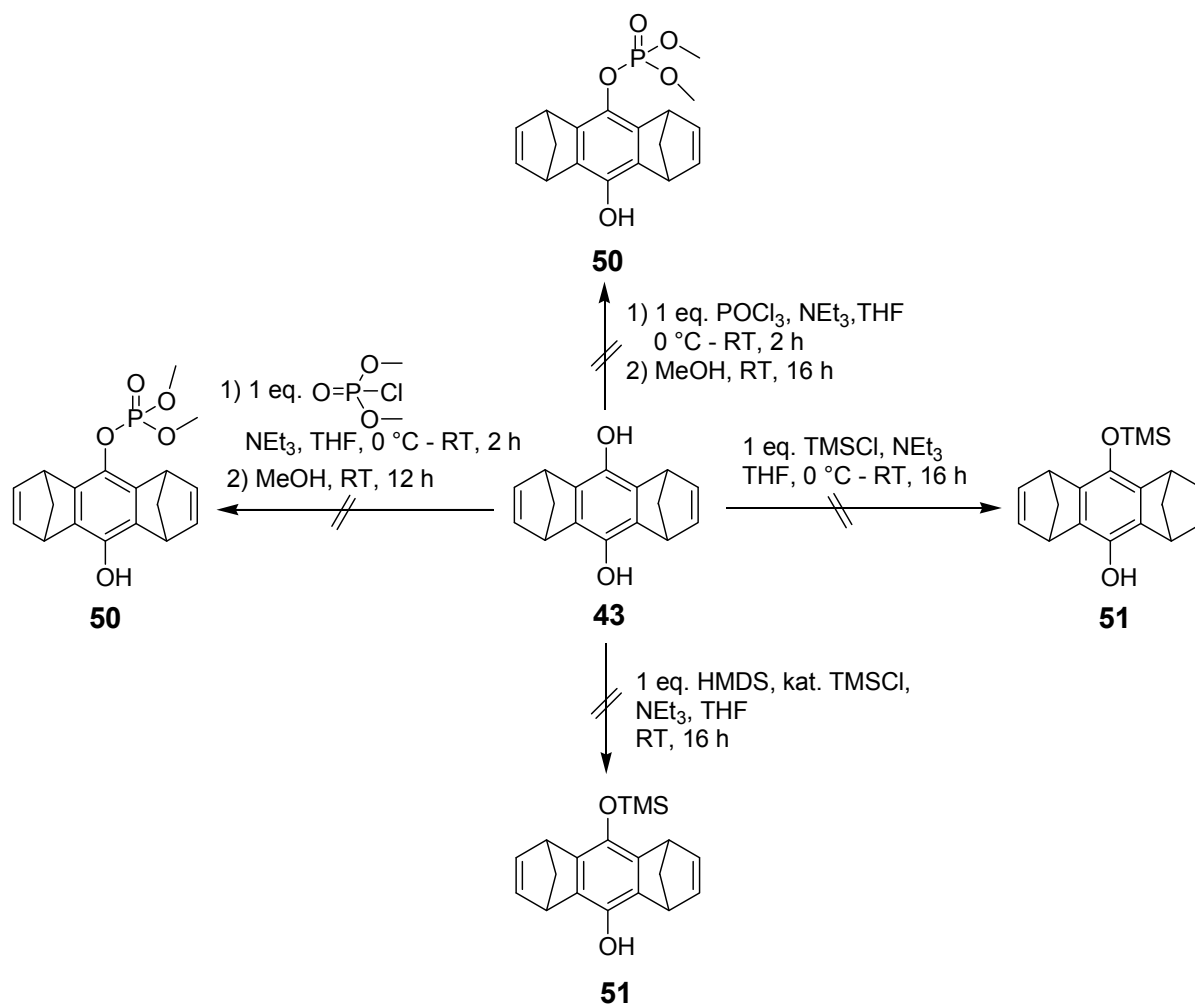
Weitere Versuche Hydroxymonophosphat-Spacer zu synthetisieren scheiterten ebenfalls. So wurde versucht den Hydrochinonspacer **43** mit einem Äquivalent  $\text{POCl}_3$  und anschließender Alkoholyse mit Methanol zu synthetisieren. Es wurde auf diese Weise aber nur die Eigenhydrolyse mit weiteren Spacermolekülen beobachtet, was auch bei Ansätzen in hoher Verdünnung nicht ausblieb. Auf diese Weise wurden unterschiedlichste di-, tri- und multimere Spacer erhalten. In Abbildung 22 sind zwei Beispiele (**48** und **49**), deren Strukturaufklärung mittels Massenspektrometrie,  $^1\text{H}$ - und  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren gelang, gezeigt.





**Abbildung 22:** Umsetzung des Hydrochinonspacers **43** mit 1 eq.  $\text{POCl}_3$  und anschließender Alkoholyse mit MeOH.

Auch weitere Versuche den Mono-Hydroxy-Mono-Phosphat-Spacer **50** mit dem Phosphorsäurechlorid-Derivat Dimethylchlorophosphat zu erhalten, wie in Abbildung 23 gezeigt, schlugen fehl. Zwar konnte das gewünschte Produkt im Rohprodukt nachgewiesen werden, war aber anscheinend so instabil, dass eine Aufreinigung nicht möglich war. Es konnte nur der Hydrochinonspacer **43** isoliert werden. Überraschenderweise ist es ausgehend vom Hydrochinonspacer **44** möglich mit Methylchlorophosphat den Mono-Hydroxy-Mono-Phosphonat-Spacer **45** zu synthetisieren. Jedoch blieb eine äquivalente Synthese des Mono-Hydroxy-Mono-Phosphat-Spacers **50** mit ähnlichen Phosphorsäurechloriden ( $\text{POCl}_3$ ,  $\text{ClP}(\text{OMe})_2$ ) ohne Erfolg (Abbildung 23).



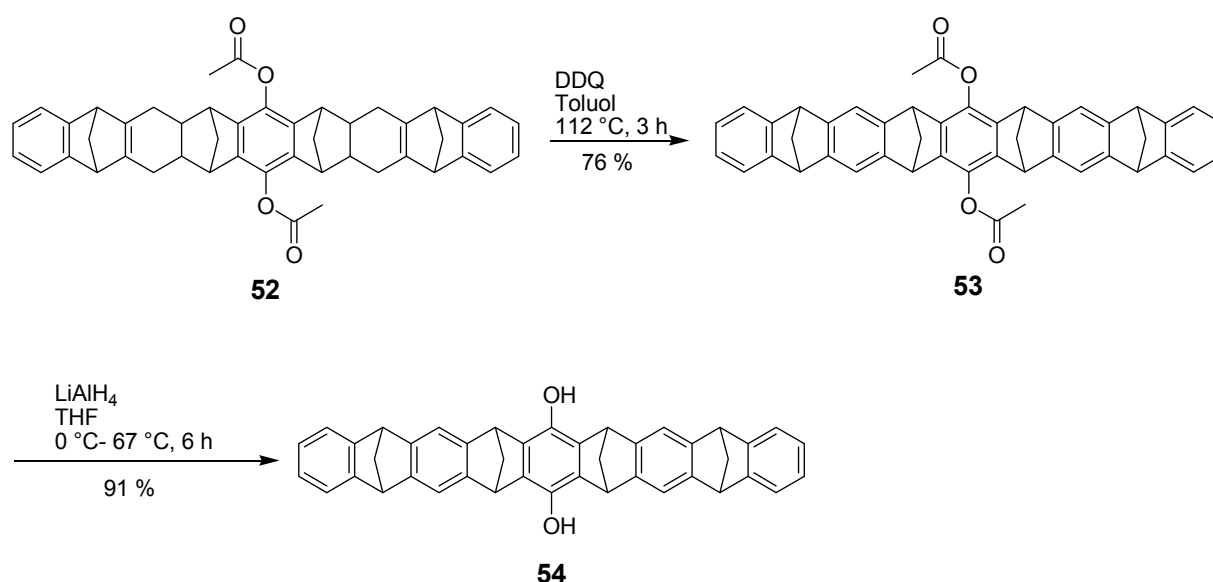
**Abbildung 23:** Versuche den Monophosphatspacer zu synthetisieren.

Eine weitere Möglichkeit den Spacer **50** zu erhalten, besteht darin, eine Hydroxygruppe selektiv mit einer Schutzgruppe zu versehen, um dann die freie Hydroxygruppe phosphorylieren zu können. Es wurde versucht eine OH-Gruppe mit der TMS-Schutzgruppe als Silylether zu schützen, um den Spacer **51** zu erhalten und diesen anschließend weiter umzusetzen. Dazu wurden zwei verschiedene Wege aus der Literatur gewählt<sup>[177]</sup>. Einerseits wurde versucht die OH-Gruppe mit einer äquivalenten Menge Trimethylsilylchlorid (TMSCl) zu verethern und alternativ mit einer katalytischen Menge TMSCl und einer äquivalenten Menge Hexamethyldisilazan (HMDS). Beide Wege führten nicht zum erwarteten Produkt **51**. Der Mono-TMS geschützte Spacer konnte nicht erhalten werden.

Anschließend wurde versucht die aus diesen Vorstudien gewonnen Erkenntnisse auf die Hydrochinonpinzette **54** zu übertragen, die aus der Acetatpinzette **53** zugänglich ist.

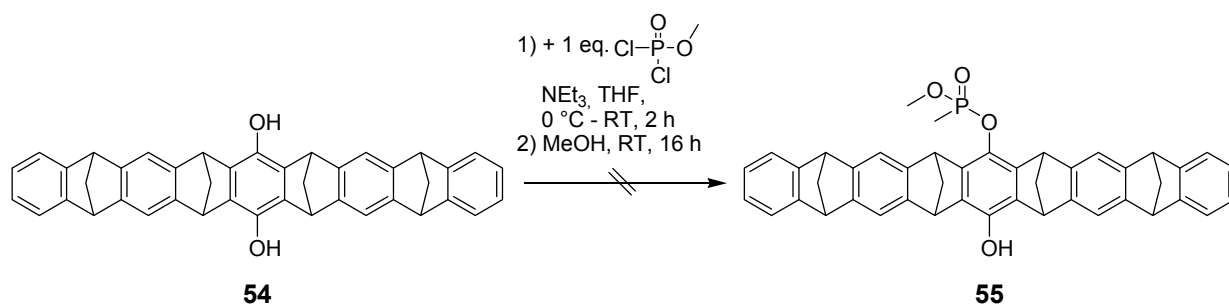
Die Acetatpinzette **53**, lässt sich aus dem Diels-Alder *Bis*-Addukt **52** durch Oxidation (Dehydrogenierung) mit DDQ gewinnen. Eine anschließende Esterspaltung mit  $\text{LiAlH}_4$  liefert die Hydrochinonpinzette **54** in guten Ausbeuten (Abbildung 24)<sup>[178]</sup>.

Die Synthese des Diels-Alder *Bis*-Addukts verläuft nach einer in der Literatur beschriebenen Syntheseroute<sup>[178]</sup>.



**Abbildung 24:** Synthese der Hydrochinonpinzette **54** aus dem Diels-Alder *Bis*-Addukt **52**.

Da mit der Modellverbindung **45** gezeigt werden konnte, dass der Hydrochinon-spacer **43** selektiv an nur einer Hydroxygruppe mit Methylphosphonsäuredichlorid phosphoryliert werden konnte, wurde der analoge Versuch mit der Hydrochinonpinzette **54** durchgeführt. Dies gelang überraschenderweise jedoch nicht und die Phosphonatpinzette **55** konnte nicht erhalten werden (Abbildung 25). Es zeigte sich, dass die gewonnenen Erfahrungen mit dem Hydrochinonspacer **43** als Modellverbindung, nicht uneingeschränkt auf die Hydrochinonpinzette **54** übertragen werden können. So kann festgehalten werden, dass die Spacereinheit **43** ein schlechtes Modellsystem für die ganze Pinzette darstellt.

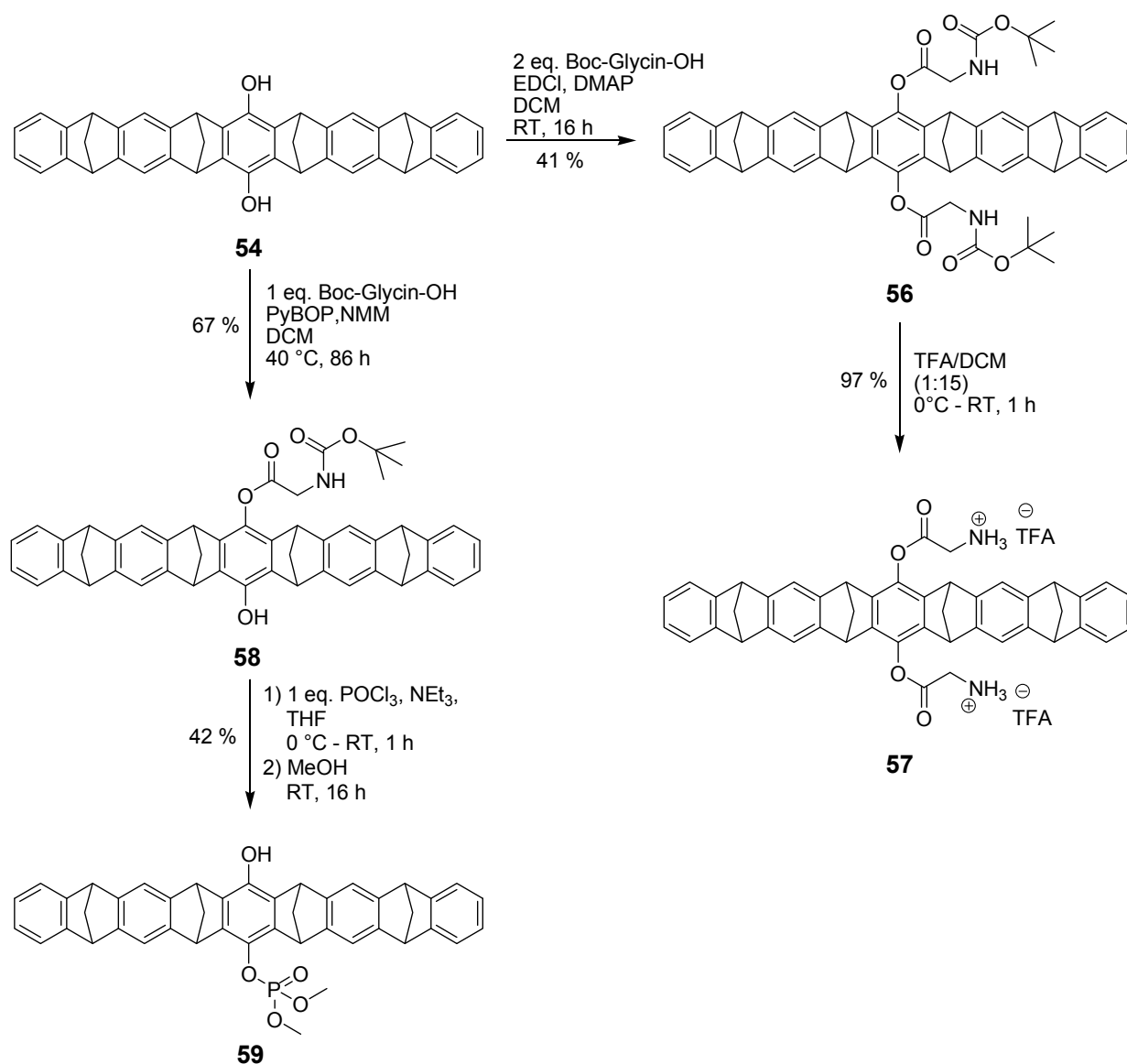


**Abbildung 25:** Syntheseversuch der Hydroxyphosphonatpinzette **55**, analog zur Synthese mit der Modellverbindung **45**.

Die Erfahrungen mit der einseitigen Veresterung des Hydrochinonspacers **43** mit der Boc-geschützten Aminosäure Glycin ließen sich hingegen mit gewissen Einschränkungen auf die Pinzette **54** übertragen. So wurde mit zwei Äquivalenten Boc-Glycin-OH, dem Kupplungsreagenz EDCI und der Base DMAP die besten Ausbeuten für die beidseitig veresterte Pinzette **56** erzielt. Beim Einsatz von einem Äquivalent Boc-Glycin-OH und den Kupplungsreagenzien, die für die Modellverbindung eingesetzt wurden (DIC, HOBt, DMAP), entstand auch ein erheblicher Anteil des Diesters **56** als Nebenprodukt. Es stellte sich heraus, dass mit PyBOP und NMM die größte Ausbeute der einseitig veresterten Pinzette **58** zu erhalten war und die wenigsten Nebenprodukte entstanden (Abbildung 26).

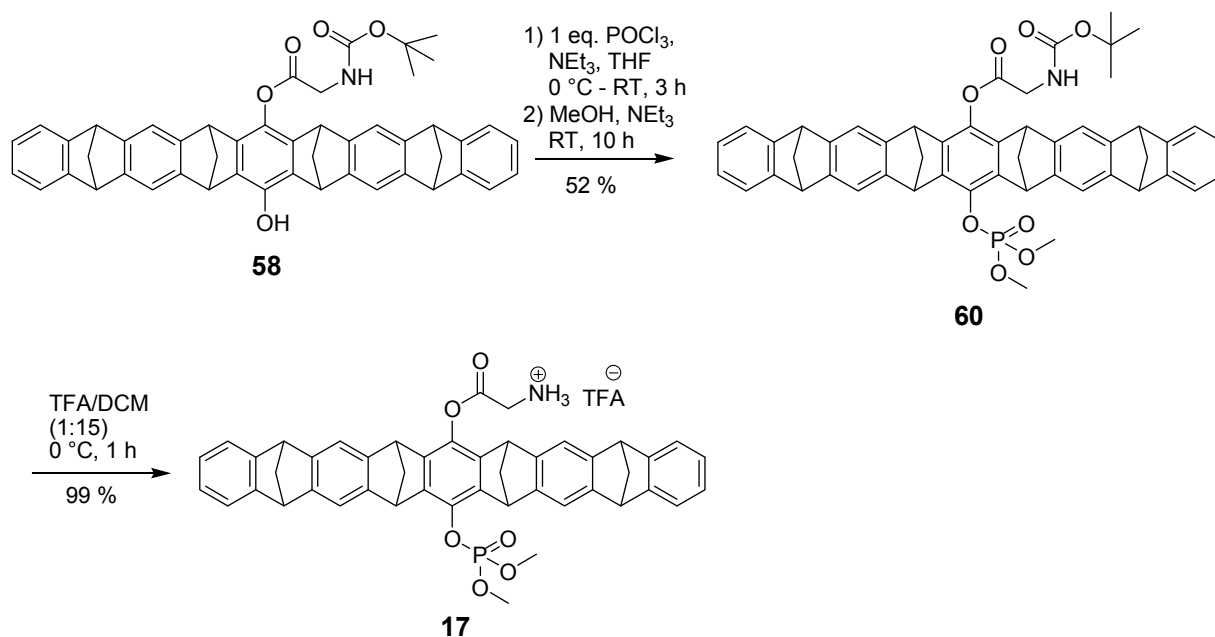
Zum Testen der Bedingungen zur Spaltung der Boc-Schutzgruppe, wurde **56** mit einer Mischung aus DCM und TFA versetzt, wobei nahezu quantitativ das Diammoniumsalz **57** erhalten werden konnte (Abbildung 26).

Beim Versuch, die Mono-Boc-Glycin-Pinzette **58** mit  $\text{POCl}_3$  zu phosphorylieren, wurde nach Zugabe von 10 Äquivalenten  $\text{NEt}_3$  vor der Alkoholyse mit Methanol nicht das erwartete Produkt erhalten, sondern die Esterspaltung des Glycinesters mit dem Überschuss an  $\text{NEt}_3$  beobachtet. Es konnte die Mono-Hydroxy-Phosphorsäuredimethylester-Pinzette **59** isoliert werden (Abbildung 26).



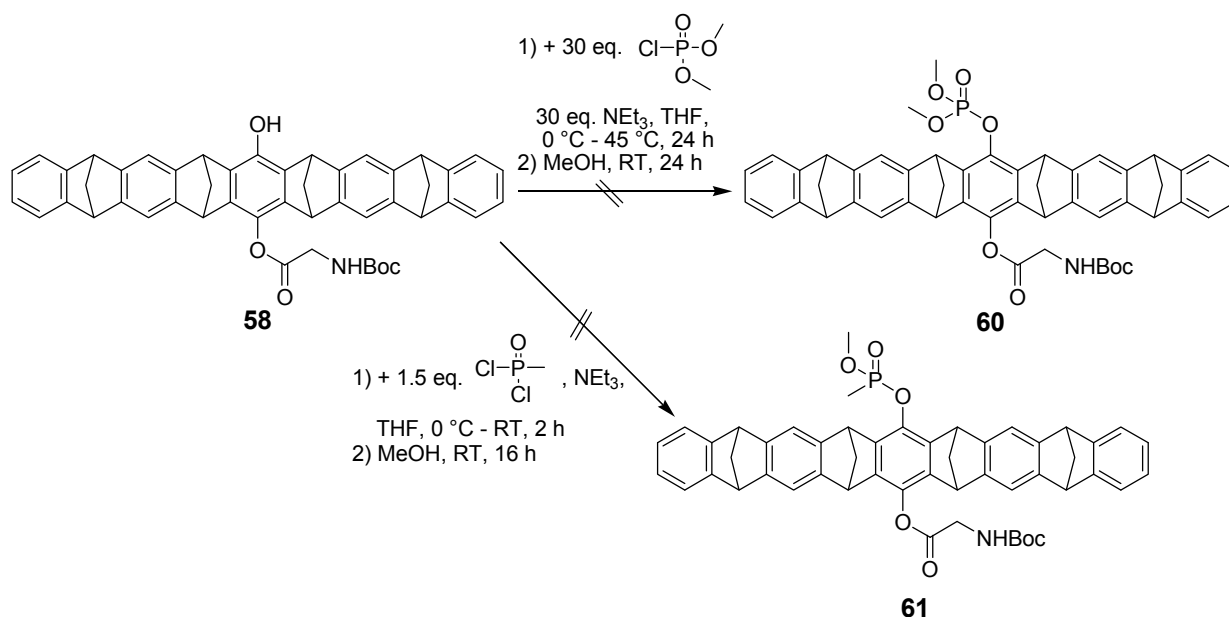
**Abbildung 26:** Syntheseroute zur beidseitig veresterten Pinzette **56**, und zur unsymmetrischen, einseitig veresterten Pinzette **58** mit anschließender Esterspaltung und Phosphorylierung.

Ausgehend von der unsymmetrischen, einseitig veresterten Pinzette **58**, gelang die Phosphorylierung zur Boc-Glycin-Phosphat-Pinzette **60** mit einer äquivalenten Mengen an POCl<sub>3</sub> und NEt<sub>3</sub>. Die anschließende Schutzgruppenabspaltung mit TFA/DCM 1:15 gelang quantitativ und das Zielmolekül **17** konnte synthetisiert werden (Abbildung 27).



**Abbildung 27:** Synthese der Boc-Glycin-Phosphatpinzette **60** mit anschließender Schutzgruppenspaltung zum Zielmolekül **17**.

Versuche, die Pinzette **58** mit 30 Äquivalenten Dimethylchlorophosphat zur Phosphatpinzette **60** umzusetzen blieben ebenso erfolglos, wie die Umsetzung der Pinzette **58** mit Methylphosphonsäuredichlorid zur Phosphonatpinzette **61** (Abbildung 28). Für beide Reaktionen konnte keine Reaktion festgestellt werden. Auch nach erheblicher Reaktionszeit und erhöhter Temperatur konnte kein Umsatz festgestellt werden und es wurden die Edukte isoliert.



**Abbildung 28:** Versuche der Darstellung der Boc-Glycin-Phosphatpinzette **60** und der Boc-Glycin-Phosphonatpinzette **61**.

Um die Ammoniumglycin-Phosphatpinzette **17** an das Cyclamgerüst zu koppeln, muss dieses mit drei Carbonsäurefunktion-tragenden Substituenten modifiziert werden. Als Spacer, der diese Carbonsäurefunktion trägt, wird Bernsteinsäure **28** eingesetzt, die mit Benzylalkohol **62** verestert wird und so als Bernsteinsäuremonobenzylester **63** dreimal an das Cyclamgerüst **30** gekuppelt wird. An dieses so modifizierte Cyclamgerüst **64** wird der Lipidanker DODA-Suc **29** an das noch freie sekundäre Amin gekuppelt, wodurch **65** in guten Ausbeuten erhalten wird. Die reduktive Entschützung der drei Benzylschutzgruppen mit Wasserstoff und Palladium auf Aktivkohle liefert den Baustein Cyclamtricarbonsäure **18** (Abbildung 29). Dieses wird benötigt, um **17** daran zu koppeln und so Rezeptor **19** zu erhalten.

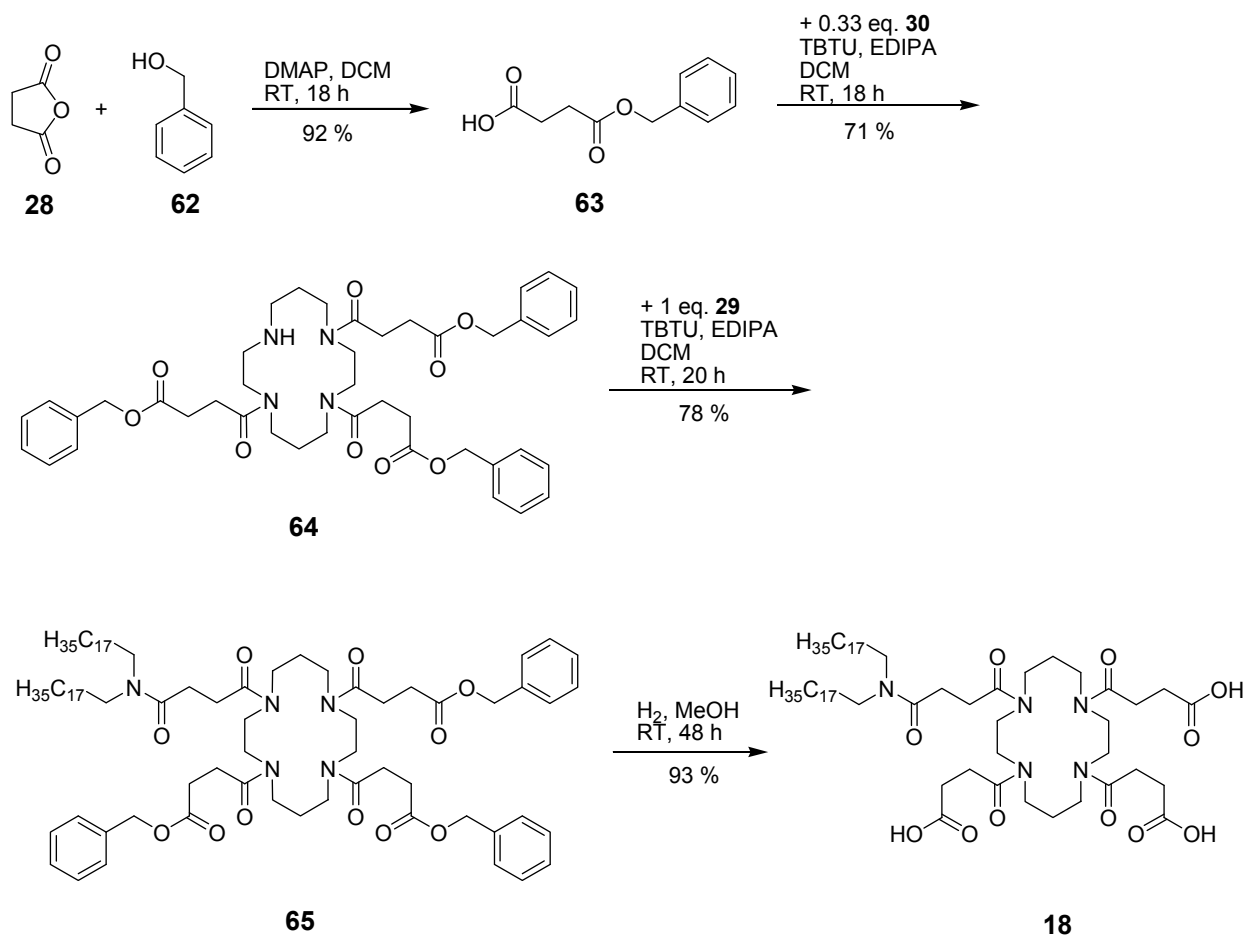
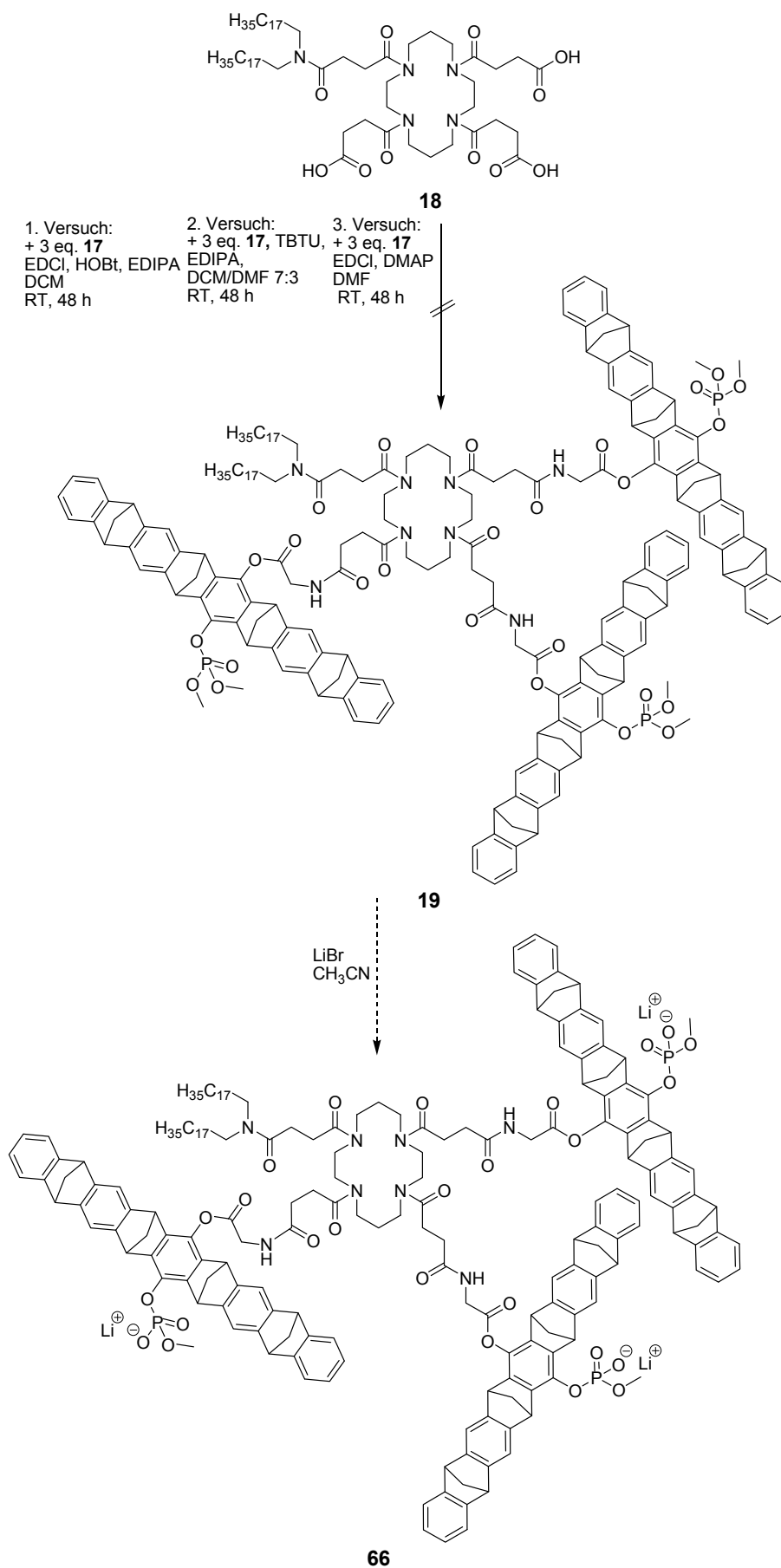


Abbildung 29: Syntheseweg zum Cyclam-Tricarbonsäure 18.

Weiter wurde versucht die Pinzette **17** an den Makrocyclus **18** zu koppeln. Die Phosphorsäuremethylester sollten, wie in Abbildung 30 gezeigt, mit LiBr zum wasserlöslichen Zielmolekül **66** gespalten werden.





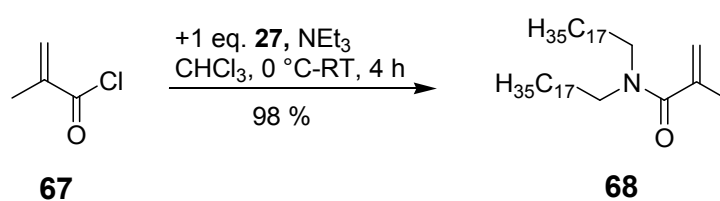
**Abbildung 30:** Geplanter Syntheseweg zum Zielmolekül **19** und zum Pinzettenrezeptorlipid **66**.

Die Kupplung der Pinzette **17** mit verschiedenen Kupplungsreagenzien und Lösungsmitteln an das Cyclamgerüst **18**, wie in Abbildung 30 gezeigt, war nicht erfolgreich möglich. Um diesen Schlüsselschritt zu erreichen, und damit den Rezeptor **19** zu synthetisieren, müssen die funktionellen Gruppen an der Pinzette vermutlich ausgetauscht werden, was zu Beginn der Synthese erfolgen muss. Damit sollte dann auch dieser Schritt in den Griff zu bekommen sein. Desweiteren ist es ebenso möglich, dass die Schwierigkeiten bei der Kupplung von der Pinzette **17** an das Tricarbonsäurecyclam **18** durch die problematische Löslichkeit des Tricarbonsäurecyclams **18** verursacht werden. Einerseits ist dieses Molekül durch die drei Carbonsäurefunktionen sehr gut in polaren Lösungsmitteln löslich, andererseits, hat es den lipophilen Dioctadecylamid-Rest. Es handelt sich bei **18** um ein ausgesprochen amphiphiles Molekül. Durch Bildung von Liposomen in organischen Lösungsmitteln, könnten alle Carbonsäurefunktionen ins Innere, also zueinander, gerichtet sein und so eine Reaktion erheblich erschweren.

### 3.1.3. Synthese der Methacrylamid-basierten lipidischen Monomere 1-4

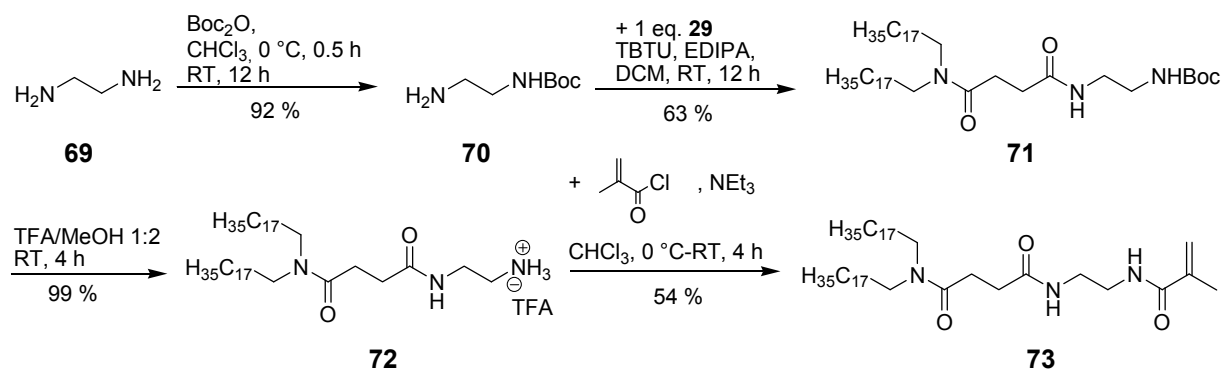
Die Synthese der Methacrylamid-basierten Monomere besteht aus zwei Teilen. Einerseits aus der Synthese der lipidischen Monomere, die später das Polymer in der Lipidschicht verankern sollen und andererseits aus der Synthese des Bisphosphonat-Monomers **2**, welches als Rezeptormonomer fungiert.

Das kurze lipidische Monomer **68** ohne Spacereinheit ist in einer Stufe, ausgehend von Methacrylsäurechlorid **67** und *N,N*-Dioctadecylamin **27**, in nahezu quantitativer Ausbeute zugänglich (Abbildung 31).



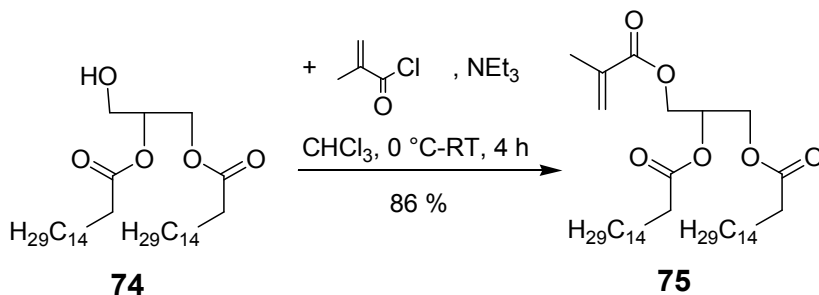
**Abbildung 31:** Synthese des kurzen lipidischen Monomers **68**.

Das lange lipidische DODA-Monomer mit Spacer **73** kann ausgehend von Ethylendiamin **69** dargestellt werden. Dazu wird **69** mit einem Äquivalent Boc<sub>2</sub>O einseitig geschützt, was in sehr guten Ausbeuten möglich ist. Durch Kupplung dieses einseitig geschützten Bausteins mit DODA-Suc **29** mittels TBTU und anschließender Spaltung der Boc-Schutzgruppe wird das primäre Ammoniumtrifluoracetatsalz **72** erhalten. Dieses kann nun in einem letzten Schritt mit Methacrylsäurechlorid **67** zum Monomer **73** umgesetzt werden.



**Abbildung 32:** Synthese des langen lipidischen Monomers **73** mit Spacereinheit.

Die Synthese des Dipalmitoylglycerol-basierten Monomers (Monomer **3**) **75** gelingt in einer Stufe, ausgehend von Dipalmitoylglycerol **74** mit Methacrylsäurechlorid **67** (Abbildung 33).



**Abbildung 33:** Synthese des Dipalmitoylglycerol-basierten Monomers **75**.

Das BP-Rezeptormonomer **2** ist in 4 Stufen, ausgehend von 3,5-Dimethylnitrobenzen **76** zugänglich<sup>[16]</sup>. Die benzyllischen Methylgruppen von **76** werden dazu mit NBS radikalisch zum 3,5-Bisbrommethylnitrobenzen **77** bromiert. Die Phosphonestergruppen werden mittels Trimethylphosphit in einer Michaelis-Arbuzov-Reaktion eingeführt. Reduktion der Nitrogruppe mit Wasserstoff an Pd/C liefert das Anilin-Derivat **79**, welches mit Methacrylsäurechlorid **67** zum Rezeptormonomer **2** umgesetzt werden kann (Abbildung 34).

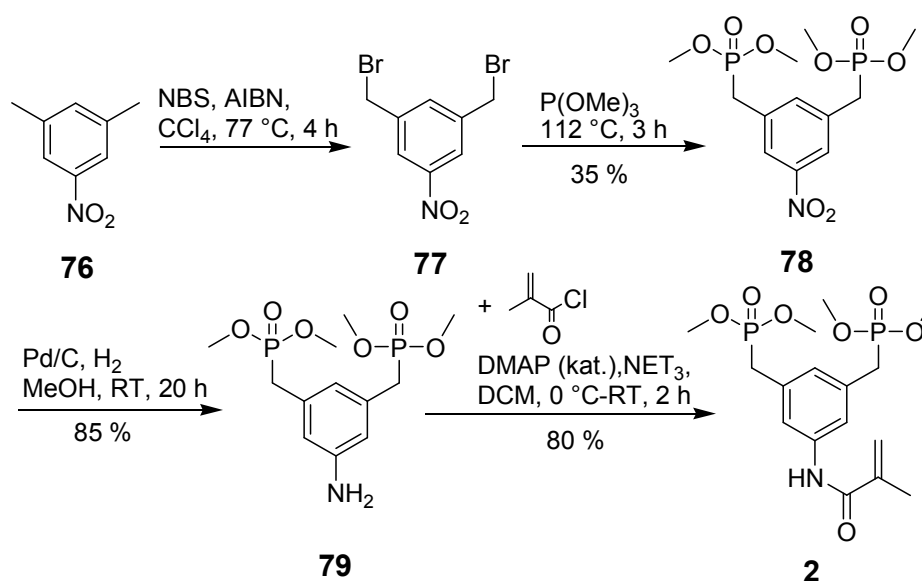


Abbildung 34: Synthese des BP-Rezeptormonomers **2**.

Die Polymerisierungsversuche der einzelnen Monomere blieben allerdings erfolglos, sobald ein lipidisches Monomer in der Reaktionslösung vorlag. Es gelang das BP-Homopolymer aus **2** darzustellen. Die Synthese der Polymere **13**, **14** und **15** blieb aber erfolglos. Vermutlich fangen die langen Alkylketten die entstehenden Radikale ab, so dass eine weitere Polymerisation gestoppt wird. Ein grundlegender systematischer Fehler konnte ausgeschlossen werden, da nach dem gleichen Prinzip das Polymer aus dem Monomer **2** erhalten werden konnte. Die ausbleibende Polymerisation ist demnach eindeutig auf die Anwesenheit der unterschiedlichen lipidischen Monomere **68**, **73** und **75** zurückzuführen.

### 3.2. Proteinoberflächenanalyse

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Bindungsstudien des Rezeptors **11** bzw. **21** mit unterschiedlichen Proteinen mittels Filmwaagetechnik, Fluoreszenz- und Rf-Spektroskopie ist es notwendig, die benutzten Proteine bezüglich ihrer Oberfläche genauer zu untersuchen, da die Bindung an der Proteinoberfläche stattfindet. Bindungsstellen für die synthetisierten Rezeptoren (BP-Bindungsmotiv) bilden dabei die positiv geladenen basischen Aminosäuren auf der Proteinoberfläche. Eine Ausnahme davon bilden die mit einem Arginin-Tag versehenen Proteine, da hier eine Bindung nicht an der Proteinoberfläche, sondern an dem Tag aus der basischen Aminosäure Arginin stattfindet.

Die Oberfläche der einzelnen Proteine wird mittels der *PROVE-Software*<sup>[179]</sup> aus Kristallstrukturdaten der *Proteindatenbank (PDB)*<sup>[180]</sup> analysiert<sup>[181]</sup>. Dabei wird die Anzahl der exponierten negativ und positiv geladenen Aminosäuren und die absolute Oberfläche erhalten. Die *PROVE-Software* berechnet basierend auf dem Survol Algorithmus unter anderem das Volumen jedes einzelnen Atoms eines Proteins und klassifiziert es als zum Lösungsmittel exponiert oder im Inneren des Proteins gelegen. Das Verteilungsmuster der verschiedenen Aminosäureklassen (sauer (negativ geladen), basisch (positiv geladen)) und eine eventuelle Domänenbildung wird mittels Visualisierung der Kristallstrukturdaten mit dem Programm *Pymol*<sup>[182]</sup> erreicht.

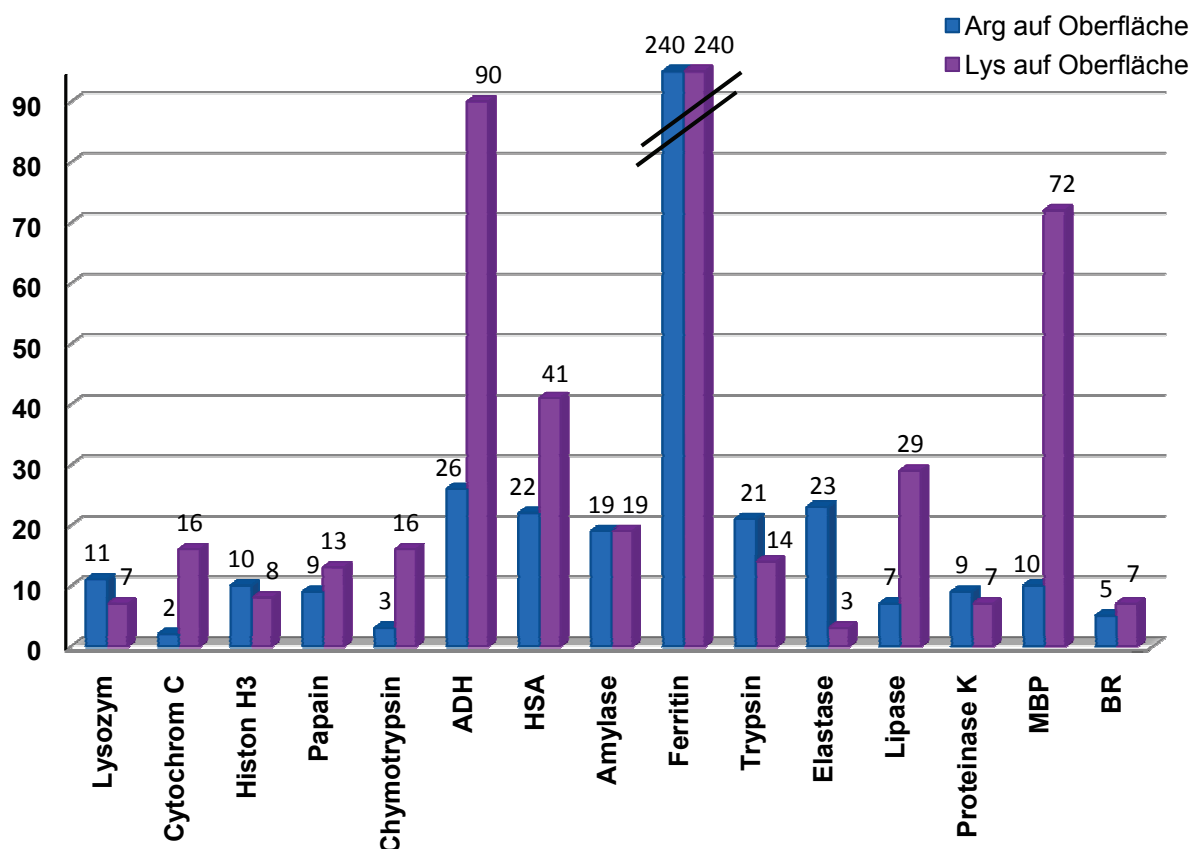
Für BSA, Casein und Histon H1 konnten keine Kristallstrukturen gefunden werden. Die Kristallstruktur von BSA konnte bisher noch nicht gelöst werden<sup>[183]</sup>. Da aber die Aminosäuresequenz des BSA zu 76 % zur derjenigen des HSA homolog ist, kann für BSA eine ähnliche Struktur, wie für HSA postuliert werden<sup>[184]</sup>. Für Casein konnten bisher keine reproduzierbaren Kristalle erhalten werden, weshalb auch für Casein keine Kristallstrukturdaten verfügbar sind<sup>[185]</sup>. Für das verwendete Histon H1 sind nur NMR-Strukturen kleinerer Fragmente bekannt, die zur Berechnung mit *PROVE* nicht verwendet werden konnten.

**Tabelle 1:** Vergleichbare Parameter der Proteine und Peptide, sortiert nach ihrer Basizität in absteigender Reihenfolge: *pI*-Wert aus Primärstruktur berechnet; Anzahl exponierter basischer Aminosäuren (Arg, Lys) bezogen auf Guanidinium- oder Ammonium-Funktion; Anzahl exponierter saurer Aminosäuren (Asp, Glu) bezogen auf Carboxylat-Funktion.

Protein	Molare		Gesamt		Asp+Glu	
	Masse [kDa]	<i>pI</i>	Oberfläche [Å <sup>2</sup> ]	Arg auf Oberfläche	Lys auf Oberfläche	auf Oberfläche
<b>Histon H3</b>	15.3	11.5	5789	10	8	8
<b>Histon H1</b>	22.0	10.4	-	-	-	-
<b>Cytochrom C</b>	12.3	9.2	6258	2	16	12
<b>Lysozym</b>	14.5	9.1	8469	11	7	9
<b>Papain</b>	21.0	8.8	9413	9	13	24
<b>Elastase</b>	26.0	8.7	10305	23	3	17
<b>Chymotrypsin</b>	25.3	8.5	10132	3	16	24
<b>Trypsin</b>	23.8	8.3	9022	21	14	14
<b>Proteinase K</b>	28.9	7.7	10078	9	7	14
<b>α-Amylase</b>	55.0	6.0	17211	19	19	85
<b>BSA</b>	66.0	5.8	-	-	-	-
<b>HSA</b>	66.0	5.8	28213	22	41	82
<b>ADH</b>	141.0	5.6	53000	26	90	258
<b>Ferritin</b>	440.0	5.4	229608	240	240	1296
<b>Lipase</b>	55.0	5.4	17195	7	29	78
<b>BR</b>	26.8	5.2	12740	5	7	18
<b>MBP</b>	42.5	5.1	28280	10	72	178
<b>Casein</b>	19.1	5.0	-	-	-	-
<b>Arg<sub>2</sub></b>	0.3	12.0	-	2	-	-
<b>Arg<sub>3</sub></b>	0.5	12.0	-	3	-	-
<b>Arg<sub>4</sub></b>	0.6	12.0	-	4	-	-
<b>Arg<sub>6</sub></b>	1.0	12.0	-	6	-	-
<b>Lys<sub>4</sub></b>	0.5	10.5	-	-	4	-

Die Proteine mit einem größeren *pI*-Wert als 7 werden als basische Proteine bezeichnet. Darunter fallen die beiden Histone H1 (lysinreich) und H3 (argininreich), welches die basischsten Proteine sind, die in dieser Arbeit untersucht wurden. Das nächstbasische Protein ist Cytochrom C, welches auf der Oberfläche einen Überschuss an Lysin-Resten trägt und mit dem argininreichen Lysozym verglichen

werden kann. Sie haben ungefähr die gleiche Oberfläche und einen ähnlichen pI-Wert. Auch Trypsin hat in etwa eine vergleichbare Größe wie Lysozym, einen niedrigeren pI-Wert aber sehr viele positive Ladungen, bedingt durch die hohe Anzahl von Arginin und Lysin auf der Oberfläche. Proteinase K, Elastase, Papain und Chymotrypsin haben ebenfalls eine ähnliche Größe wie Lysozym, unterscheiden sich jedoch im pI-Wert, der bis fast in den neutralen Bereich bei der Proteinase K reicht. Papain und Proteinase K haben ein ausgewogenes Verhältnis zwischen Arginin und Lysin auf der Oberfläche, während Elastase ein argininreiches Protein und Chymotrypsin ein lysinreiches Protein darstellt. ADH ist mit einem pI-Wert von 5.6 sauer, trägt neben der negativen Nettoladung und den sauren Aminosäuren aber auch viele basische Aminosäurereste auf der Oberfläche<sup>[186]</sup>. Mit seiner enormen Oberflächengröße fällt es jedoch aus dem Vergleich untereinander heraus. Die Verhältnisse des Arginin- und Lysinanteils auf der Oberfläche der einzelnen Proteine, sowohl der Basischen, als auch der Sauren, ist in Abbildung 35 wiedergegeben.

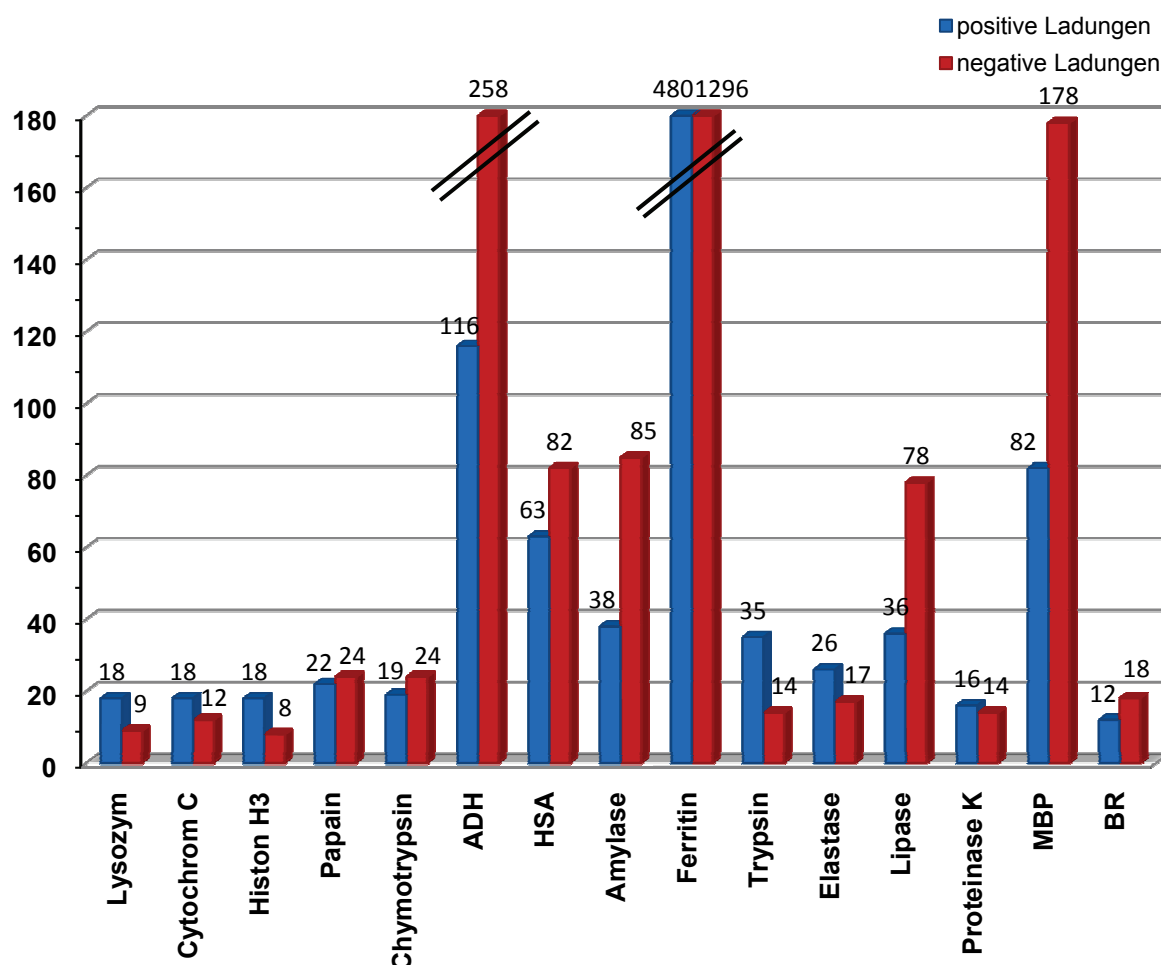


**Abbildung 35:** Anzahl der Arginin- und Lysinreste auf der Oberfläche der untersuchten Proteine.



Die untersuchten sauren Proteine tragen eine negative Ladung durch die Häufung von Glutamat- und Aspartat-Resten auf der Oberfläche. Als saure Proteine wurden hier  $\alpha$ -Amylase und Lipase untersucht, die auch hinsichtlich ihrer Größe vergleichbar sind. BSA und HSA, sollten eine vergleichbare Größe aufweisen und eine ähnliche Oberflächenbeschaffenheit. Ferritin ist ein extrem großes saures Protein, mit einem ausgewogenen Verhältnis von Arginin- und Lysinresten, aber einem großen Überschuss an Glutamat und Aspartat. Casein ist das sauerste Protein, welches hier untersucht wurde, bindet aber stark an Phosphate, weswegen hier eine Untersuchung auch von Interesse ist<sup>[187, 188]</sup>.

Das Verhältnis der basischen und sauren Aminosäuren auf der Oberfläche hat einen Effekt auf die Nettoladung der Proteine. Diese erwartete Ladung ist in Abbildung 36 gezeigt. Die basischen Proteine Lysozym, Cytochrom C, Histon H3, Chymotrypsin, Proteinase K und Papain besitzen alle in etwa die gleiche Anzahl positiver Ladungen auf der Oberfläche und haben vergleichbare Größe.

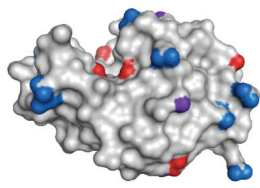


**Abbildung 36:** Nettoladungen auf der Oberfläche der Proteine (positive Ladung entspricht basischem Protein (blau), negative Ladung entspricht saurem Protein (rot)).

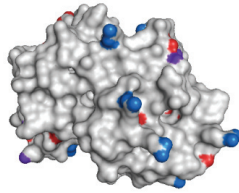
Eine Sonderstellung nehmen die beiden Proteine Bakteriorhodopsin (BR) und Maltosebindendes Protein (MBP) ein. Bakteriorhodopsin ist ein saures Protein mit nur geringem Anteil an basischen Aminosäuren auf der Oberfläche. Es handelt sich beim BR um ein integrales Membranprotein. Dieses kann nur innerhalb der Membran untersucht werden, weswegen hier auch Wechselwirkungen mit der Membran nicht vernachlässigt werden dürfen. Außerdem wird nicht nur natives BR eingesetzt, sondern auch solches, welches rekombinant mit einem Arginin-Tag bestehend aus 7-Argininen, als BR-R7 untersucht wird. Eine Bindung sollte dann am basischen Tag stattfinden.

Das MBP ist ein saures Protein, welches durch seine Größe viele basische Aminosäuren auf der Oberfläche trägt, aber auch doppelt so viele Saure, wodurch seine negative Nettoladung resultiert. In dieser Arbeit wurde kein natives MBP untersucht, sondern eines mit einem 10er Arg-Tag, welches als MBP-R10 bezeichnet wird. Die Einführung des Tags macht zwar immer noch kein basisches Protein aus dem MBP, aber die lokale Einführung einer künstlichen basischen Domäne in das Protein bewirkt einerseits eine Erhöhung des pI auf 6.4 und andererseits bildet die starke Konzentration von 10 Arginin auf kleinstem Raum einen Angriffspunkt für das BP-Rezeptorlipid und sollte so eine Bindung ermöglichen. Als Negativkontrolle wurde MBP mit einem Histidin-Tag eingesetzt (MBP-H10), welches weiterhin einen pI von 5.1 tragen sollte.

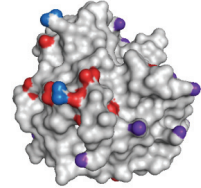
In Abbildung 37 sind die aus den Kristallstrukturdaten erhaltenen visualisierten Oberflächen einzelner Proteine dargestellt. Basische Aminosäurereste sind in Blautönen, saure Aminosäurereste in rot eingefärbt. Es bestätigt sich die aus Tabelle 1 ersichtliche Oberflächenverteilung von basischen und sauren Aminosäuren. Die relativ kleinen Oberflächen von Lysozym, Cytochrom C, Papain, Histon H3, Chymotrypsin und Proteinase K zeigen eine hohe Konzentration an basischen Aminosäuren. Trypsin weist eine saure und auf der gegenüberliegenden Seite eine basische Domäne auf. Diese beiden Domänen sind durch eine neutrale Oberfläche voneinander getrennt. ADH, Elastase und  $\alpha$ -Amylase zeigen eine gleichmäßig statistische Verteilung aller Aminosäurereste und Lipase, HSA und Ferritin eine eindeutig sauer dominierte statistische Verteilung der einzelnen geladenen Aminosäurereste.



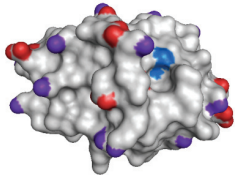
Lysozym



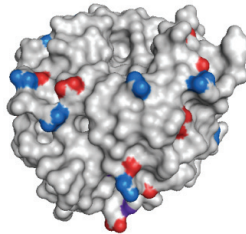
Papain



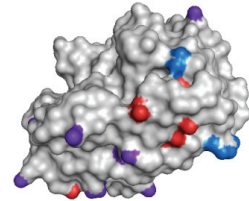
Chymotrypsin



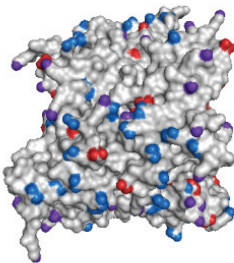
Cytochrom C



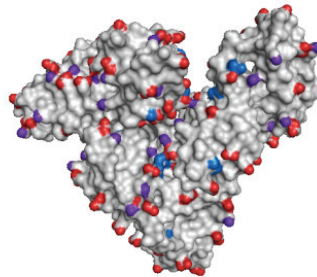
Proteinase K



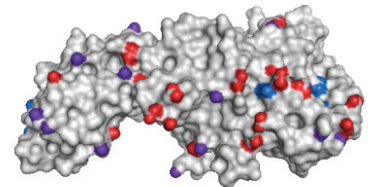
Trypsin



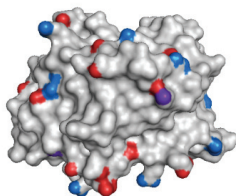
Histon H3 (Arg reich)



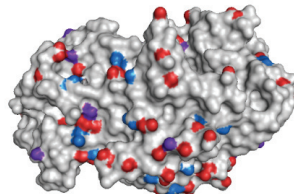
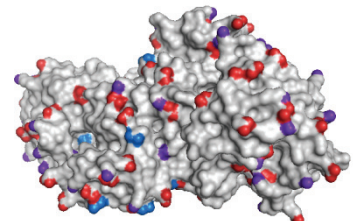
HSA



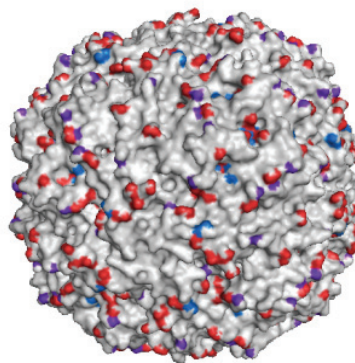
Lipase



Elastase

 $\alpha$ -Amylase

ADH



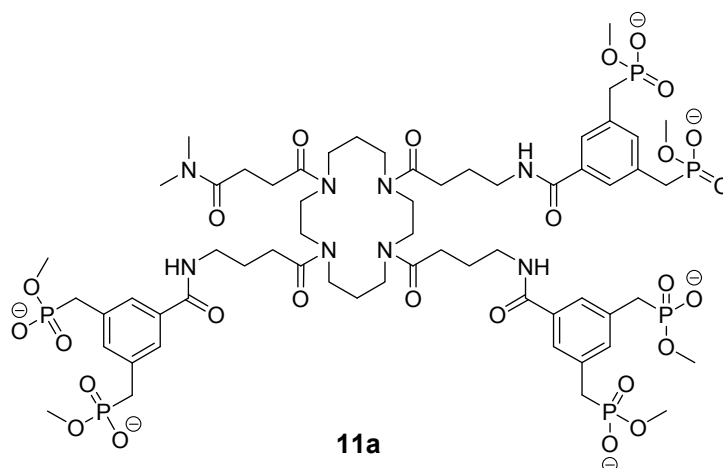
Ferritin

**Abbildung 37:** Visualisierte Proteinoberflächen aus Kristallstrukturdaten mit eingefärbten geladenen (basische oder saure Domänen) Aminosäure: blau: Arg, lila: Lys, rot: Asp+Glu.

### 3.3. Molecular Modelling mit dem vereinfachten Rezeptor 11a und kurzen Arginin-Oligopeptiden

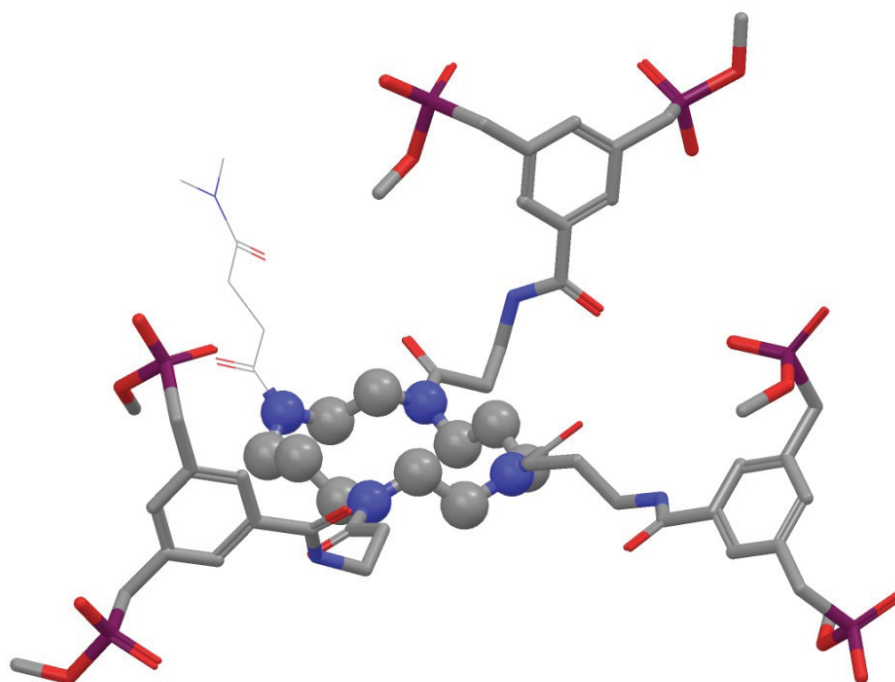
Die rechnerischen Methoden *in silico* haben in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen und geholfen passende Rezeptoren für bestimmte Strukturen (Liganden) zu entwickeln<sup>[189]</sup>. Dabei sind Moleküldynamik-Studien und Monte-Carlo-Simulationen die heutzutage am häufigsten genutzten rechnerischen Versuche, Bindungen und Bindungsaffinitäten zu untersuchen und vorherzusagen<sup>[190-192]</sup>.

Die Bindungseigenschaften des Rezeptorlipids **11** wurden nicht nur experimentell, wie in den folgenden Abschnitten beschrieben, sondern auch mittels rechnerischen Methoden *in silico* untersucht. Dazu wurde das Programm *MacroModel 9.0*<sup>[193]</sup> mit einer Maestro 7.0 Schnittstelle benutzt. Für die durchgeführten Moleküldynamiken (MD-Studien) und die Monte-Carlo-Simulationen (MC-Simulationen) wurde dabei nicht das Rezeptorlipid **11** eingesetzt, sondern die vereinfachte Form **11a**, bei der der in den Rechnungen störende und zu Unübersichtlichkeit führende Lipidanker (die langen Alkylketten) durch kurze Methylgruppen ersetzt wurden. Dies sollte keinen Einfluss auf den Rezeptor und seine Bindungseigenschaften haben, da der Lipidanker nicht an der Erkennung von Peptiden und Proteinen beteiligt ist, sondern den Rezeptor in der Lipidschicht verankert.



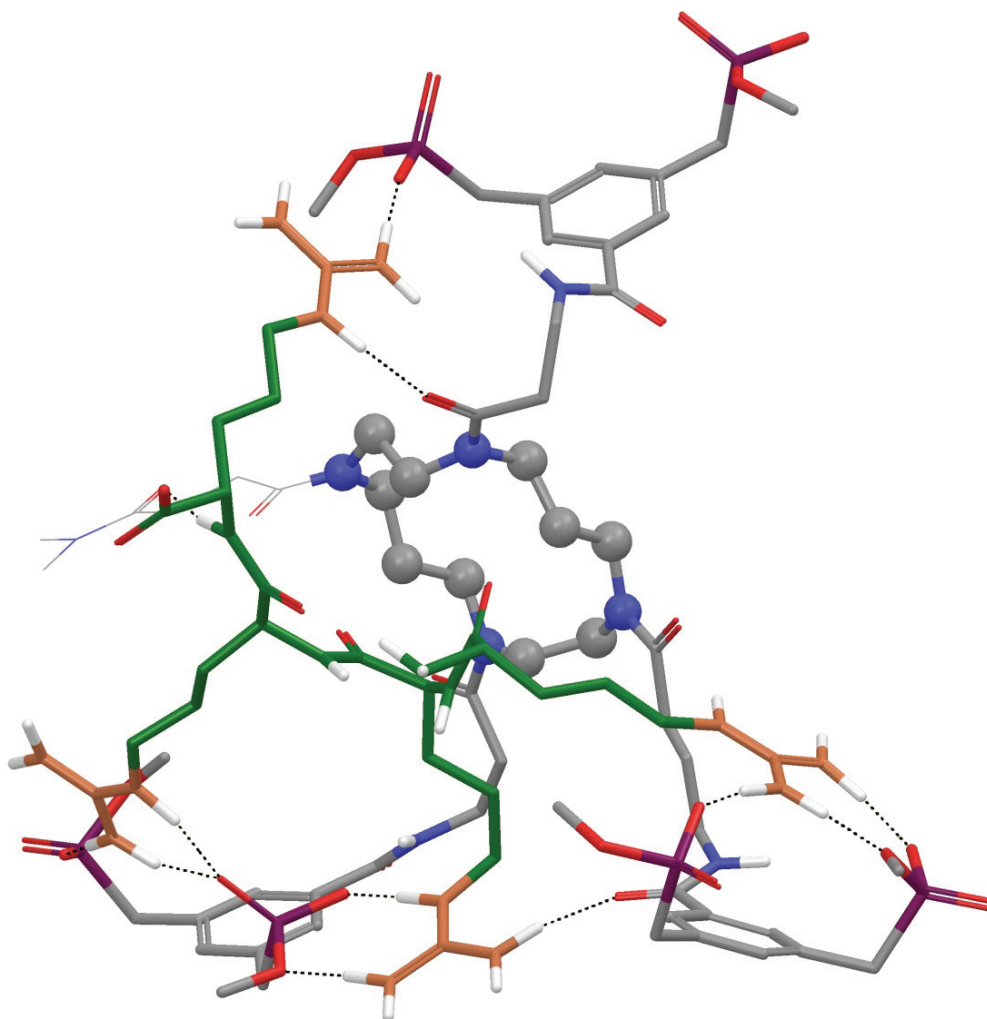
Die durchgeführten Rechnungen wurden in Wasser mit dem Kraftfeld OPLS und 2000 Schritten durchgeführt. Die Moleküldynamik wurde für einen Zeitraum von 10 ns berechnet.

Zuerst wurde eine Moleküldynamik für den Rezeptor **11a** über 10 ns durchgeführt, um zu sehen, ob die drei BP-Rezeptoreinheiten aufgrund der Beweglichkeit des Cyclam-Grundgerüsts in die gleiche Richtung zeigen, oder ob auch Rezeptoreinheiten auf die Rückseite gerichtet sind. Während der gesamten Moleküldynamik sind alle drei BP-Einheiten zur gleichen Seite gerichtet. Auch in der nachfolgenden Energieminimierung wurden nur Strukturen erhalten, in denen die BP-Einheiten auf der gleichen Seite des Makrocyclus liegen. Daher kann davon ausgegangen werden, dass alle drei Rezeptoreinheiten in **11**, ebenso wie in **11a**, an der Bindung von Oligopeptiden und Proteinen beteiligt sein können (Abbildung 38).



**Abbildung 38:** Minimumstruktur des vereinfachten Rezeptors **11a** nach Moleküldynamik (10 ns) und anschließender Monte-Carlo-Simulation, MacroModel 9.0, OPLS, Wasser, 2000 Schritte).

Als nächstes wurde ein Tetraarginin-Peptid in die in Abbildung 38 gezeigte Minimumstruktur des Rezeptors **11a** gelegt. Auch hier wurde eine Moleküldynamik-Simulation über 10 ns berechnet. Dabei ist zu erkennen, dass das Peptid immer vom Rezeptor gebunden bleibt und nur leichte Bewegungen des Systems vorhanden sind.



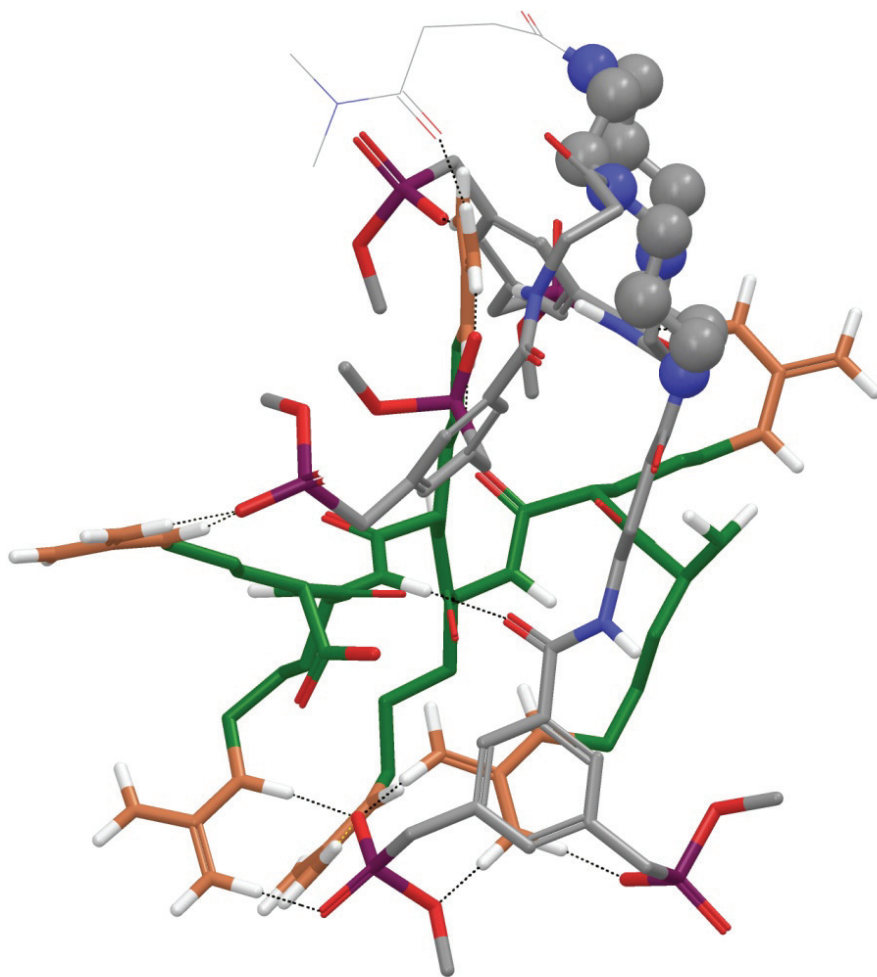
**Abbildung 39:** Minimumstruktur von **11a** mit Tetraarginin-Peptid ( $\text{Arg}_4$ ) nach Moleküldynamik (10 ns) und anschließender Monte-Carlo-Konformerensuche (MacroModel 9.0, OPLS, Wasser, 2000 Strukturen). Schwarz gestrichelt: Wasserstoffbrückenbindungen, grün: Argininpeptid, braun: Guanidinium-Gruppen des Arginins, grau, blau Kugeln: Cyclamgerüst.

Ausgehend von der letzten Struktur der Moleküldynamik wurde eine Monte-Carlo-Konformerensuche (Energiminimierung) durchgeführt, wobei die in Abbildung 39 gezeigte Minimumstruktur gefunden wurde. Alle drei BP sind an der Bindung des Peptids beteiligt. Das BP in Abbildung 39 unten rechts, zeigt das typische BP-Guanidinium-Kation-Bindungsmotiv, wie es bereits in Abbildung 1 gezeigt ist, mit der

$\pi$ -Kation-Wechselwirkung zwischen Benzen-Ring und dem Guanidinium-Kation, den elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den negativ geladenen Sauerstoffatomen des Bisphosphonats und des Kations, sowie den Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Protonen der Guanidinium-Stickstoffatome und den Sauerstoffatomen des BP. Insgesamt bindet jedes BP eine Guanidinium-Gruppe des Arginins. Dabei werden zwei Guanidinium-Ionen, mit dem erwarteten Bindungsmodus, von den BP gebunden. Das in Abbildung 39 hintere Guanidinium-Ion kann nicht mehr richtig von dem BP gebunden werden, da die Entfernung zu groß ist, so dass nur eine Wasserstoffbrücke mit dem negativ geladenen BP-Ion und dem Proton der Guanidinium-Gruppe ausgebildet wird. Verstärkend wird noch eine Wasserstoffbrücke mit dem Carbonyl-Sauerstoffatom des GABA-Spacers ausgebildet. In Abbildung 39 vorne, wird noch eine Guanidinium-Funktion zwischen zwei BP komplexiert, wobei ebenfalls drei Wasserstoffbrücken ausgebildet werden, dabei eine zum Carbonyl-Sauerstoffatom der Benzoesäure.

Als nächstes wurde eine Moleküldynamik-Simulation mit **11a** und einem Hexaarginin-Peptid berechnet. Auch hierbei bleibt der Komplex fast starr und das Peptid fest im Rezeptor gebunden. Durch die Bewegungen wird das Peptid optimal ausgerichtet und findet immer mehr Bindungsstellen. Ausgehend von der Endstruktur der MD-Simulation wurde auch hier wieder eine Energieminimierung durchgeführt und die in Abbildung 40 gezeigte Minimumstruktur erhalten. Auch hier sind wieder alle drei BP an der Bindung des Peptids beteiligt und ein BP zeigt wieder das typische Bindungsmotiv mit einer Guanidinium-Gruppe. Dabei werden insgesamt fünf Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet, an denen drei Guanidinium-Gruppen beteiligt sind. Die anderen BP binden jeweils nur ein Guanidinium-Kation. Eine Guanidinium-Gruppe bleibt sogar bis auf eine Wasserstoffbrücke zum Carbonyl-Sauerstoffatom des GABA-Spacers ungebunden und zeigt frei in das Umgebungsmedium.

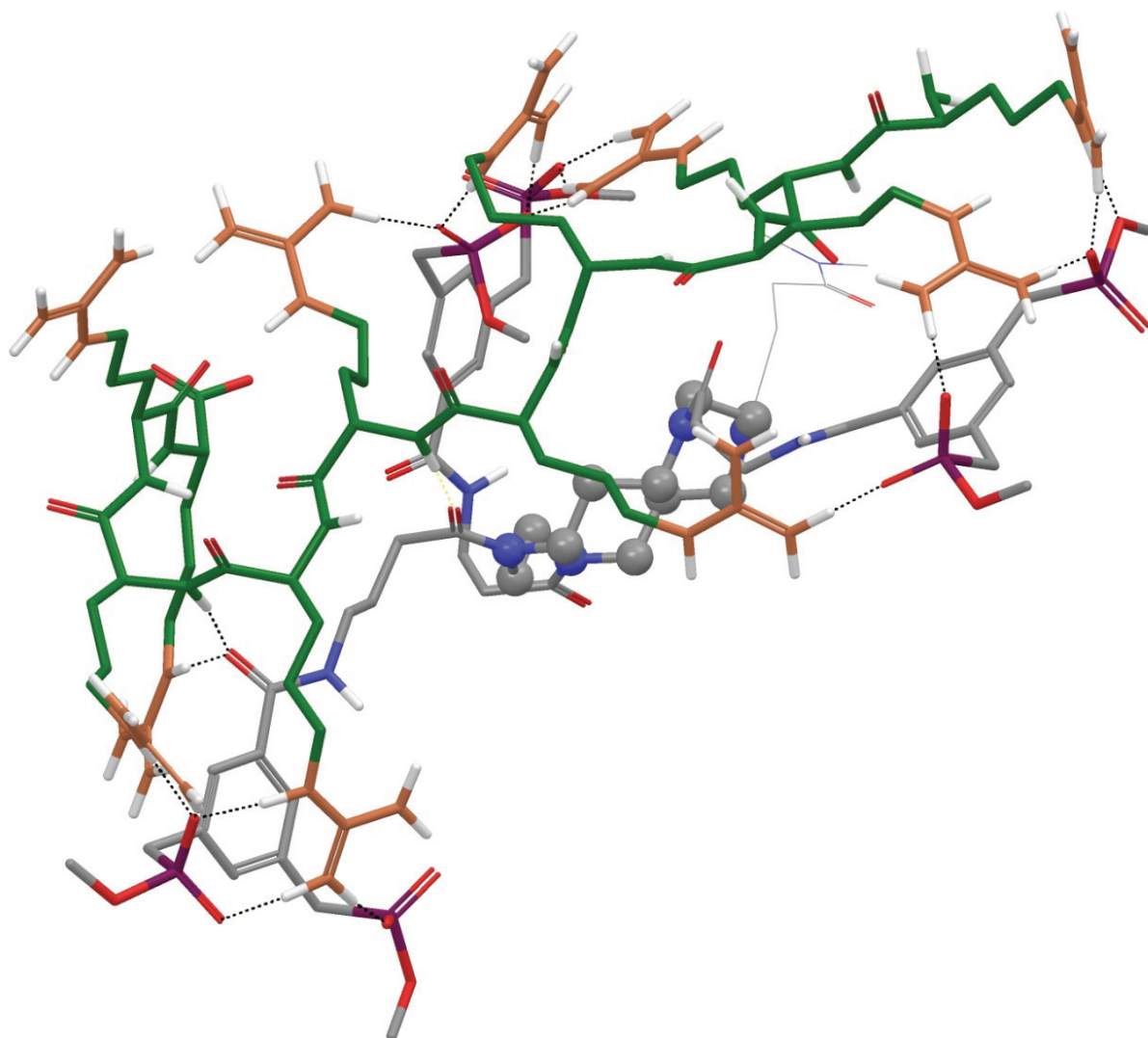




**Abbildung 40:** Minimumstruktur von **11a** mit Hexaarginin-Peptid (Arg<sub>6</sub>) nach Moleküldynamik (10 ns) und anschließender Monte-Carlo-Konformerensuche (MacroModel 9.0, OPLS, Wasser, 2000 Strukturen). Schwarz gestrichelt: Wasserstoffbrückenbindungen, grün: Argininepeptid, braun: Guanidinium-Gruppen des Arginins, grau, blau Kugeln: Cyclamgerüst.

Als nächstes wurde eine Moleküldynamik-Simulation mit **11a** und einem Decaarginin-Peptid als Modell für den 10er Arginin-Tag (R-10) berechnet. Hierbei bleibt der Komplex starr und das Peptid fest im Rezeptor gebunden. Ausgehend von der Endstruktur der MD-Simulation wurde hier wieder eine Energieminimierung durchgeführt und die in Abbildung 41 gezeigte Minimumstruktur erhalten. Alle drei BP binden jeweils drei Guanidinium-Gruppen über fünf bis sechs intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen. Zwei BP binden über das typische  $\pi$ -Kation-Motiv, wie in Abbildung 1 gezeigt. Eine Guanidinium-Gruppe bleibt komplett ungebunden und zeigt frei in das Umgebungsmedium.



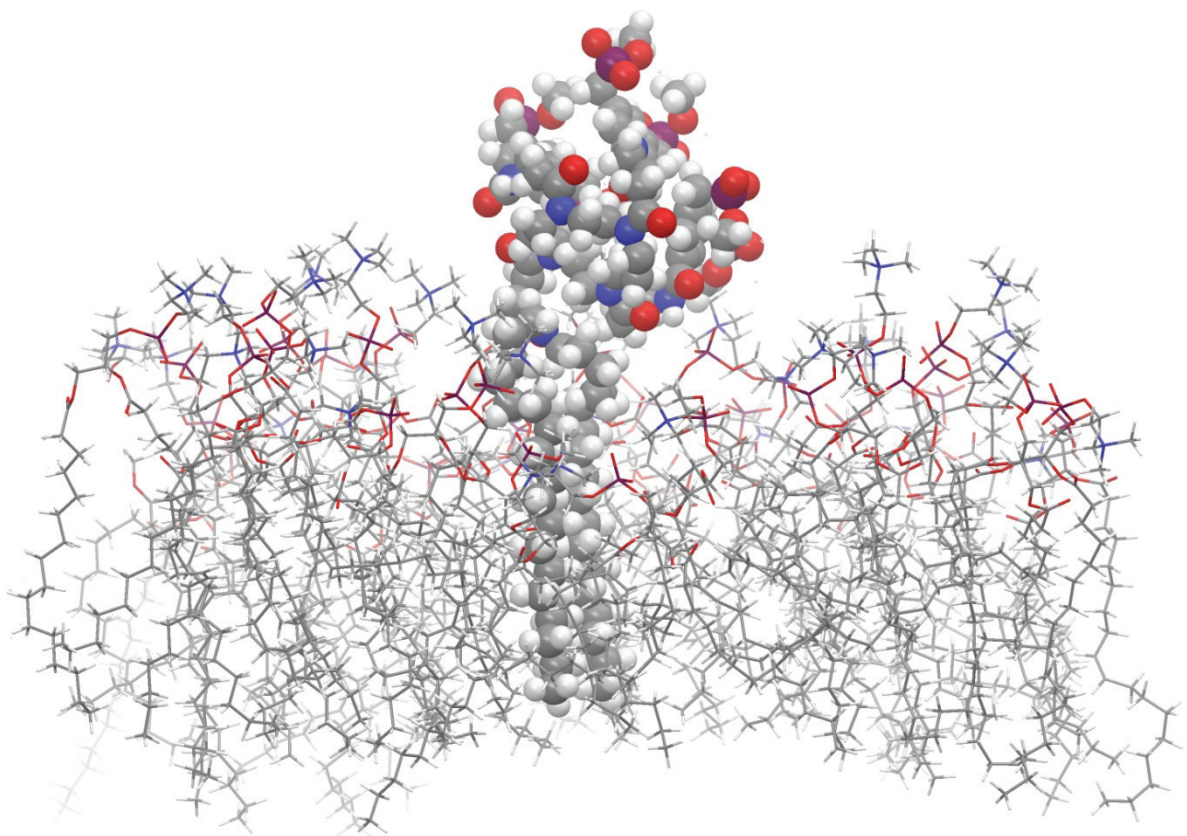


**Abbildung 41:** Minimumstruktur von **11a** mit Decaarginin-Peptid (Arg<sub>10</sub>) nach Moleküldynamik (10 ns) und anschließender Monte-Carlo-Konformerensuche (MacroModel 9.0, OPLS, Wasser, 2000 Strukturen). Schwarz gestrichelt: Wasserstoffbrückenbindungen, grün: Argininpeptid, braun: Guanidinium-Gruppen des Arginins, grau, blau Kugeln: Cyclamgerüst.

Die Rechnungen zeigen eindeutig die Leistungsfähigkeit des Rezeptors **11** zur Bindung von Arginin-Peptiden unterschiedlicher Länge. Dabei wird schon das kurze Tetraarginin-Peptid sehr fest gebunden und bleibt in der Moleküldynamik-Simulation über 10 ns fest vom Rezeptor gebunden. Das System wird in der Moleküldynamik mit steigender Länge des Peptids immer unbeweglicher und starrer, was die mit steigender Peptidlänge immer stabiler werdenden Komplexe kennzeichnet. So bildet das Tetraarginin-Peptid elf intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen und eine  $\pi$ -Kation-Bindung aus, das Hexaarginin schon dreizehn intermolekulare Wasserstoff-

brückenbindungen und eine  $\pi$ -Kation-Bindung und das Decaarginin-Peptid bildet siebzehn Wasserstoffbrückenbindungen und zwei  $\pi$ -Kation-Bindungen zum Rezeptor **11a** aus.

Das Rezeptorlipid **11** wurde in eine SOPC-Monolipidschicht eingelagert und eine Energieminimierung durchgeführt, wobei die in Abbildung 42 gezeigte Minimumstruktur erhalten wurde. Das Rezeptorlipid **11** verbleibt fest gebunden in der Lipidmonoschicht.



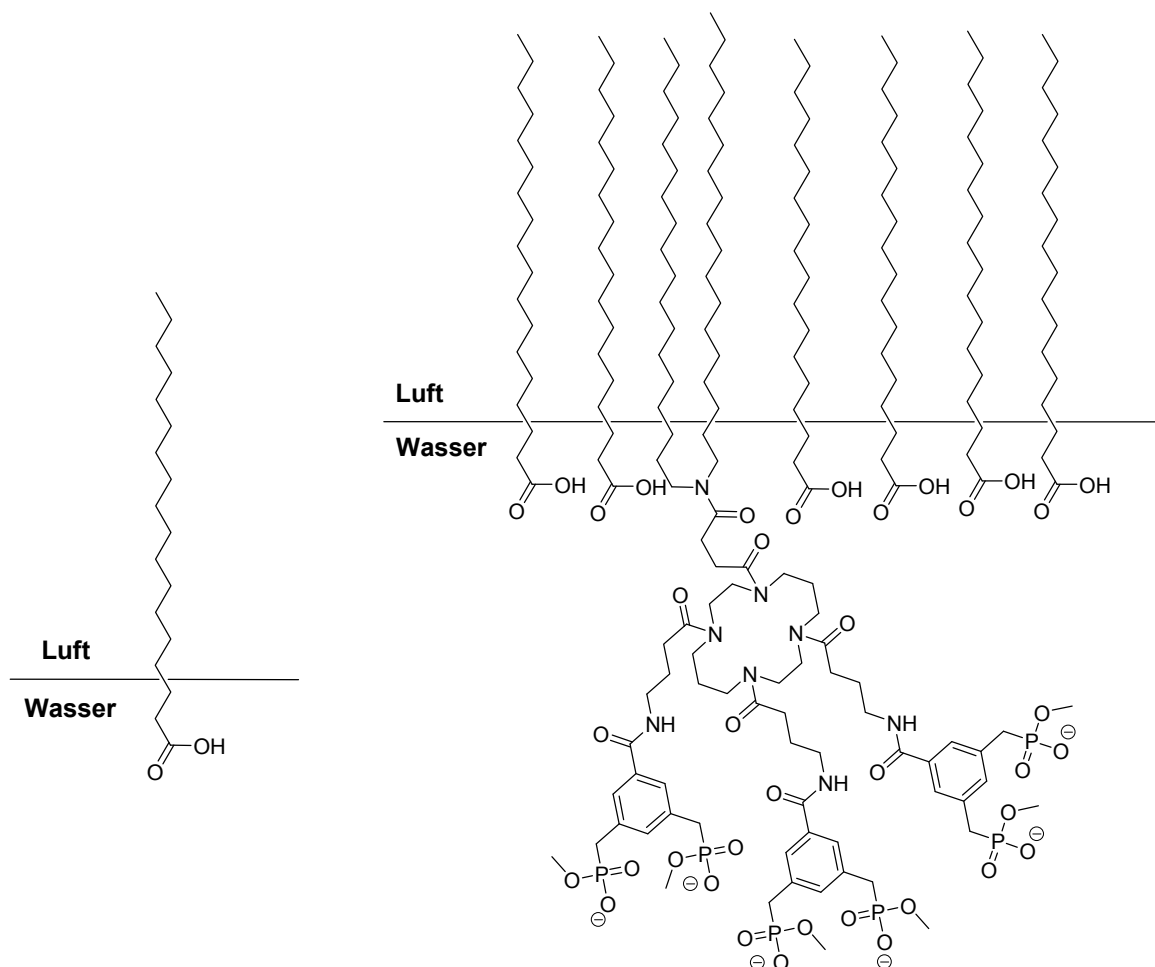
**Abbildung 42:** In SOPC-Lipidschicht eingelagertes Rezeptorlipid **11**.

### 3.4. Untersuchungen des Rezeptorlipids 11 an der Luft-Wasser-Grenzfläche mittels der Filmwaagetechnik

Untersuchungen von monomolekularen Schichten auf wässrigen Oberflächen (Langmuir-Filme) begannen schon sehr früh. Man kann bis ins historische Babylon zurückgehen, wo Öl auf Wasser getropft wurde, um aus dem Verhalten des Ölfilms die Zukunft vorherzusagen<sup>[194]</sup>. Hingegen begann im 19. Jahrhundert *A. Pockels* mit den ersten systematischen Untersuchungen von Monoschichten an der Luft-Wasser-Grenzfläche<sup>[195-198]</sup>. In den folgenden 25 Jahren berichteten *L. Rayleigh*<sup>[199]</sup>, *H. Devaux*<sup>[200]</sup> und *W. B. Hardy*<sup>[201]</sup> über die amphiphilen Strukturen dieser Langmuir-Filme. *I. Langmuir* war dann schließlich derjenige, der die Monoschichten amphiphiler Moleküle systematisch untersuchte<sup>[202]</sup>.

Die Untersuchungen von Lipidmonoschichten als Modellmembranen (SAM) fanden zuerst an der Luft-Wasser-Grenzfläche statt, wie bereits in der Einleitung erwähnt<sup>[154]</sup>. Amphiphile Moleküle, wie z.B. Stearinsäure, bilden, wenn sie in ein wässriges System gegeben werden, spontan Strukturen aus, in denen die hydrophoben und hydrophilen Gruppen für sich optimale Umgebungen einnehmen. Wird die Stearinsäure in organischen, leicht flüchtigen Lösungsmitteln, wie Chloroform, vorsichtig auf die wässrige Oberfläche getropft (Spreiten von Lipiden), bildet sich spontan eine monomolekulare Lipidschicht an der Oberfläche aus (SAM), bei der die polare Kopfgruppe ins Wasser und die hydrophobe Alkylkette in die Luft ragt (Abbildung 43). Dabei ragen die ersten beiden Methylengruppen nach der Carboxylfunktion noch mit in die Wasserphase<sup>[203]</sup>. Ebenso wie die Stearinsäuremoleküle ist auch das Rezeptorlipid **11** ein Amphiphil (Detergens) und sollte sich an der Luft-Wasser-Grenzphase ebenso verhalten. Der hydrophile Teil, die BP-Rezeptoreinheiten mit dem Cyclamgerüst, sollte ins Wasser zeigen und der hydrophobe Teil, der Lipidanker bestehend aus dem Dioctadecylamid, sollte aus dem Wasser heraus in die Luft zeigen. Eine Monoschicht aus Stearinsäure sollte also mit dem Rezeptorlipid funktionalisiert werden können (Abbildung 43). Die polaren Kopfgruppen, die ins Wasser gerichtet sind, könnten dann in der Subphase gelöste

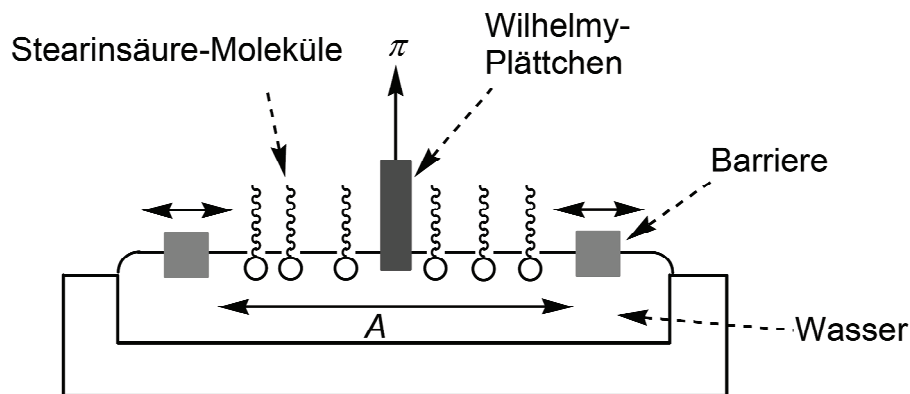
Gäste über Wasserstoffbrückenbindungen oder *Coulomb*-Wechselwirkungen erkennen. Auf diese Weise wurden auch schon unterschiedlichste bioaktive Moleküle, wie Nucleinbasen, Nucleotide, Aminosäuren, Peptide und Zucker durch amphiphile Rezeptoren erkannt<sup>[204]</sup>.



**Abbildung 43:** Links: Orientierung eines Stearinsäuremoleküls an der Luft-Wasser-Grenzfläche<sup>[203]</sup>. Rechts: Einlagerung des Rezeptorlipids **11** in eine Stearinsäuremonoschicht.

Die Erkennung von Molekülen mit Rezeptoren, die Wasserstoffbrückenbindungen nutzen oder in physiologischen Systemen (Puffer, 150 mM NaCl, pH = 7.5) mittels Coulomb-Wechselwirkungen binden, ist sehr schwierig, da die Mediumseinflüsse die Bindung ihrerseits erheblich schwächen<sup>[205]</sup>. An der Grenzfläche jedoch ist die Dielektrizitätskonstante ( $\epsilon = 81$  für reines Wasser) erheblich verringert<sup>[203, 206]</sup>. Die molekulare Erkennung findet also an der Grenzfläche unter erniedrigter Dielektrizitätskonstante statt, so dass die polaren nichtkovalenten Wechselwirkungen weniger stark geschwächt werden, als in reinem Wasser<sup>[206]</sup>.

Um nun das Rezeptorlipid an der Grenzphase zu untersuchen, wurde eine Filmwaage nach *Langmuir* verwendet (Abbildung 44).



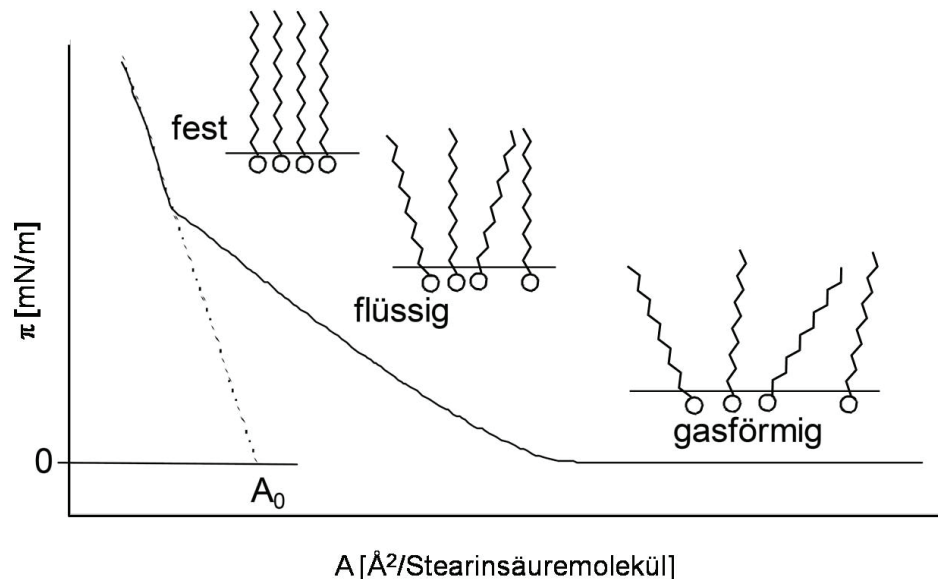
**Abbildung 44:** Schematischer Aufbau einer Langmuir-Filmwaage.

Wie bereits weiter oben angesprochen erhält man die Monoschichten, indem die amphiphilen Moleküle in einer verdünnten Lösung in leicht flüchtigen organischen Lösungsmitteln auf die wässrige Subphase, die sich in dem Teflontrog der Filmwaage befindet, gegeben werden. Nachdem das Lösungsmittel verdampft ist, bleibt die Monoschicht des Moleküls zurück, die als zweidimensionales Gas bezeichnet wird, da die einzelnen Moleküle sehr weit voneinander entfernt sind. Durch die beiden beweglichen Barrieren kann die Oberfläche A verkleinert werden. Die Moleküle an der Luft-Wasser-Grenzphase werden dadurch zusammengedrückt. Dabei nimmt der Oberflächendruck  $\pi$ , der mit dem *Wilhelmy*-Plättchen<sup>[207]</sup>, welches in die Flüssigkeit taucht, gemessen wird, zu. Der Oberflächendruck  $\pi$  ist die Differenz zwischen der Oberflächenspannung von reiner ( $\sigma_0$ ) und von mit einer Monoschicht belegter Flüssigkeitsoberfläche ( $\sigma$ ).

$$\pi = \sigma_0 - \sigma$$

(Gleichung 2)

Da die Anzahl der Moleküle auf der Oberfläche und die Fläche, die von der Monoschicht bedeckt wird, bekannt sind, kann daraus die Fläche pro Molekül ( $\text{\AA}^2$ ) berechnet und daraus ein Druck-Flächen-Diagramm ( $\pi$ -A-Isotherme) erstellt werden (Abbildung 45). Der Oberflächendruck wird also als Funktion der Fläche pro Molekül dargestellt<sup>[203]</sup>.



**Abbildung 45:** Idealisiertes Druck-Flächen-Diagramm ( $\pi$ /A-Isotherme).

Das Druck-Flächen-Diagramm ist gekennzeichnet durch drei charakteristische Bereiche. In der gasförmigen Phase sind die Moleküle wie ein zweidimensionales Gas auf der Oberfläche zufällig verteilt und die Fläche pro Molekül ist sehr groß. Idealerweise gibt es keine intermolekularen Wechselwirkungen. Bei Verkleinerung der Oberfläche durch Bewegung der Barrieren, werden die intermolekularen Abstände verkleinert und die Moleküle näher aneinander gepresst, wodurch der Oberflächendruck ansteigt. Es kann ein Phasenübergang in die flüssige Phase (auch: flüssig-expandierte Phase) beobachtet werden (dies ist allerdings nicht bei allen Amphiphilen der Fall, bei Stearinsäure aber schon). Die Moleküle beginnen sich auszurichten, wobei die Alkylkette in die Luft zeigt. Bei weiterer Verkleinerung der Fläche wird der nächste Phasenübergang in die feste Phase erreicht. In dieser Phase sind die Moleküle dicht gepackt und einheitlich orientiert. Bei weiterer Verkleinerung der Fläche kollabiert die Monoschicht irreversibel aufgrund

mechanischer Instabilität und ein rapider Abfall des Oberflächendrucks wird beobachtet<sup>[208]</sup>. Das Druck-Flächendiagramm in Abbildung 45 ist eine idealisierte Darstellung. In Wirklichkeit sind zahlreiche Übergangsphasen, wie flüssig-ausgedehnt oder flüssig-kondensiert bekannt und beschrieben worden<sup>[209, 210]</sup>.

Die Extrapolation der Steigung der festen Phase auf einen Oberflächendruck von  $\pi = 0$  ergibt quantitative Informationen über die Moleküldimension. Die Fläche pro Molekül  $A_0$ , ist die hypothetische Fläche, die ein Molekül in der festen Phase bei einem Oberflächendruck von 0 mN/m hätte (Abbildung 45).

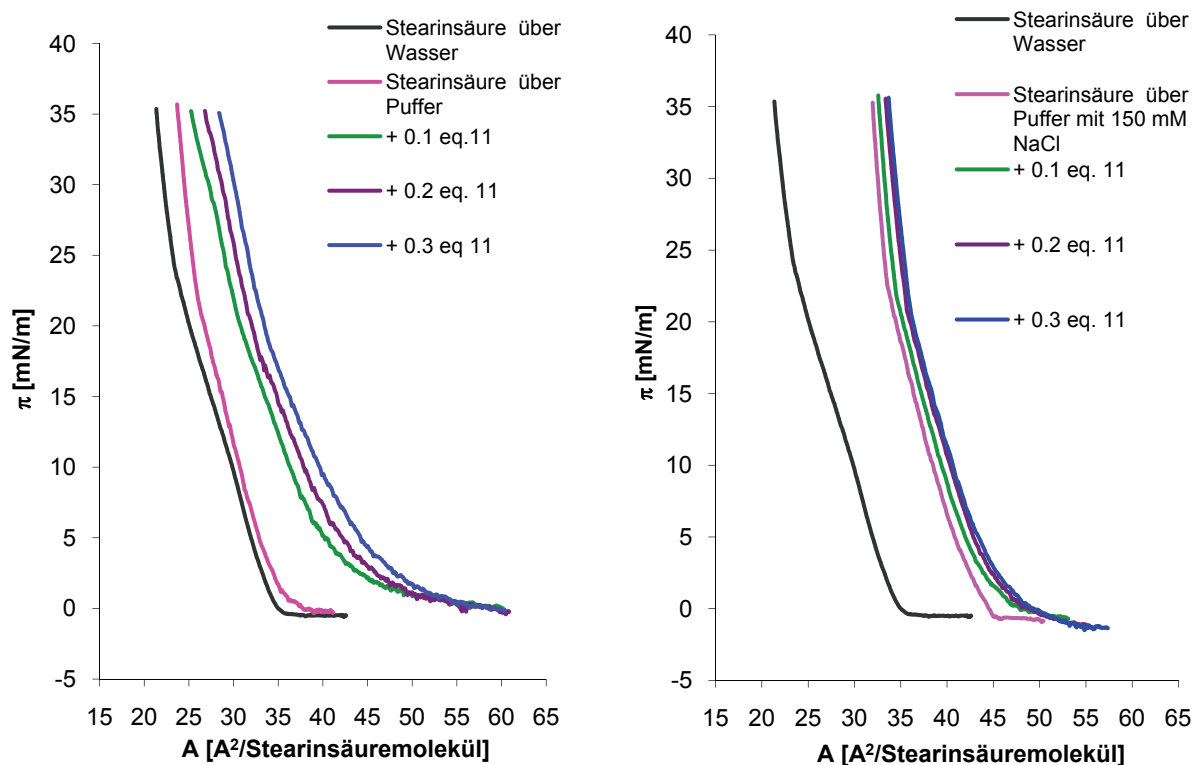
Da in unserem Arbeitskreis von *O. Molt* und *R. Zadnark* gute Erfahrungen mit Stearinsäure als Monoschichtbildner gemacht wurden, wurde auch in den für diese Arbeit durchgeführten Experimenten mit Stearinsäure gearbeitet.

Das Spreiten der Stearinsäure aus Methanol/Chloroform Gemischen führte zu unstabilen Monoschichten, da das Methanol einen großen Teil der Stearinsäuremoleküle mit in die Subphase reißt. Daher wird die Stearinsäure (25  $\mu$ L) als 3.5 mM Lösung aus Chloroform auf die Oberfläche gespreitet und ergibt auf Wasser einen  $A_0$ -Wert von 27  $\text{\AA}^2/\text{Molekül}$  bei einem Oberflächendruck von 24 mN/m. Auch auf HEPES-Puffer (20 mM, pH = 7.5) bildet sich eine stabile Monolage aus Stearinsäuremolekülen aus, mit einem leicht größeren  $A_0$ -Wert von 29  $\text{\AA}^2/\text{Molekül}$  und einer Oberflächenspannung von 22 mN/m (Abbildung 46, links). Ob die Subphase aus reinem Wasser oder gepufferter wässriger Lösung besteht, macht also für die Monolage keinen großen Unterschied, weswegen alle Messungen in gepufferter Lösung durchgeführt werden konnten.

Die Monoschichten aus Stearinsäure kollabieren bei einem Oberflächendruck oberhalb von 37 mN/m und einer Fläche unterhalb von 20  $\text{\AA}^2/\text{Molekül}$ , unabhängig ob die Subphase aus reinem Wasser oder 20 mM HEPES-Puffer (pH = 7.5) besteht.

Die Einlagerung von 0.1 eq. des Rezeptors **11** erfolgt durch Auftropfen von 5  $\mu$ L der 1.75 mM Lösung des Rezeptorlipids **11** in Chloroform/Methanol 3:1 auf die Stearinsäuremonoschicht, bei einem geringen Oberflächendruck von 10 mN/m. Anschließend werden die Barrieren mit einer Geschwindigkeit von 50  $\text{cm}^2/\text{min}$  dreimal geschlossen und wieder geöffnet, bevor die Messung aus einer vollkommen entspannten Monolage (0 mN/m) mit einer langsamen Verringerung der Fläche (Kontraktion der Monoschicht) beginnt. Durch Zugabe von 0.1 eq. des Rezeptors **11**

verschiebt sich die Druck-Flächen-Isotherme zu größeren Flächen. Auch bei weiterer Zugabe von jeweils 0.1 eq. des Rezeptors **11** kann noch eine kleine Verschiebung der Isotherme, hin zu größerer Fläche, gemessen werden. Diese Flächenvergrößerung ist mit einer Einlagerung des Rezeptors in die Monoschicht zu erklären. Dabei ist bei der ersten Zugabe von 0.1 eq. **11** die Verschiebung mit  $9 \text{ \AA}^2/\text{Molekül}$  auf  $38 \text{ \AA}^2/\text{Molekül}$  am größten. Die weitere Zugabe von jeweils 0.1 eq. **11** erhöht die Fläche pro Molekül nur noch um jeweils 2 bzw.  $1 \text{ \AA}^2/\text{Molekül}$  auf 40 bzw.  $41 \text{ \AA}^2/\text{Molekül}$ . Die ersten 0.1 eq. des Rezeptors werden aufgrund der starken Flächenzunahme, trotz der sehr guten Wasserlöslichkeit des Moleküls, anscheinend nahezu komplett in die Monoschicht eingelagert. Die nachfolgenden Zugaben von jeweils 0.1 eq. an Rezeptor **11** bewirken nur noch einen geringen Anteil an Flächenvergrößerung pro Molekül. Die Monoschicht scheint mit den ersten 0.1 eq. **11** nahezu komplett belegt zu sein und die weiteren Rezeptormoleküle werden nicht weiter in die Monoschicht eingelagert, da sonst mit einer weiteren Aufweitung um  $9 \text{ \AA}^2/\text{Molekül}$  gerechnet würde. Die meisten Rezeptormoleküle der zweiten und dritten Zugabe verbleiben anscheinend gelöst in der wässrigen Subphase (Abbildung 46, links). Aus diesem Grund werden alle nachfolgenden Messungen mit einer Zugabe von 0.2 eq. **11** durchgeführt.

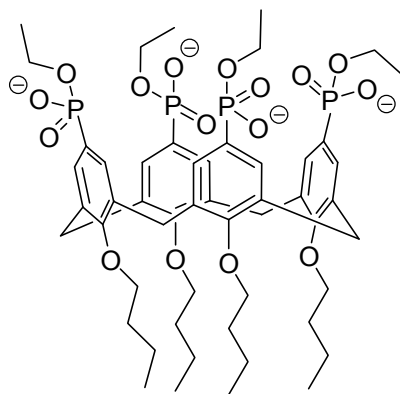


**Abbildung 46:** Einlagerung des Rezeptorlipids **11** in eine Stearinsäuremonoschicht. Links: mit 20 mM HEPES-Puffer, pH = 7.5. Rechts: mit 20 mM HEPES-Puffer, 150 mM NaCl, pH = 7.5.



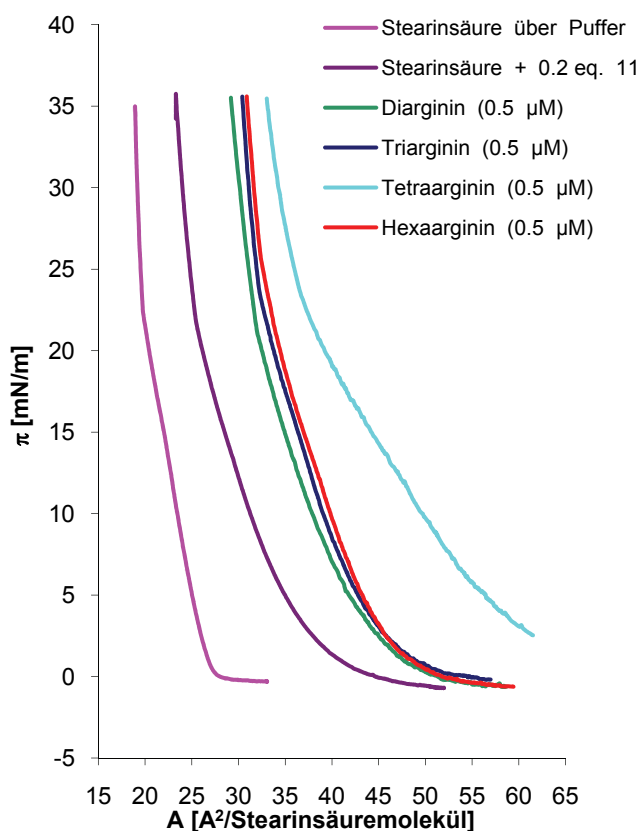
Versuche, den HEPES-Puffer mit 150 mM NaCl für die Filmwaagemessungen zu nutzen, waren nicht erfolgreich, da der Einfluss der Salzkonzentration auf die Stearinsäuremonoschicht schon sehr groß ist (Abbildung 46, rechts). Alleine die Zugabe von 150 mM NaCl erhöht die Fläche pro Molekül von  $29 \text{ \AA}^2/\text{Molekül}$  über HEPES-Puffer auf  $36 \text{ \AA}^2/\text{Molekül}$ . Eine weitere Einlagerung von 0.1 eq. Rezeptor **11** findet unter diesen Bedingungen anscheinend nicht mehr statt, da nur noch ein ganz kleiner Anteil ( $2 \text{ \AA}^2/\text{Molekül}$ ) an Flächenaufweitung gemessen werden kann. Die Zugabe von Weiteren 0.1 eq. des Rezeptors führen nochmals zu einer Flächenaufweitung von  $1 \text{ \AA}^2/\text{Molekül}$ . Bei nochmaliger Zugabe von 0.1 eq. des Rezeptors ist keine weitere Einlagerung mehr zu verzeichnen. Die hohe Salzfracht im Puffer verhindert eine effektive Einlagerung des Rezeptors **11** in die Monoschicht, da die  $\text{Na}^+$ -Ionen schon eine Wechselwirkung mit der Stearinsäuremonoschicht eingehen, was die große Aufweitung um  $7 \text{ \AA}^2/\text{Molekül}$  zeigt. Diese kommt alleine dadurch zustande, dass der Puffer mit 150 mM NaCl versetzt wurde. Aus diesem Grund wurden die Messungen in HEPES-Puffer ohne Salzzusatz durchgeführt.

Da das Bisphosphonatbindungsmotiv **1** als Rezeptor für Argininderivate und basische Aminosäuren schon untersucht wurde<sup>[16, 65, 170]</sup>, wird für den neuen Rezeptor auch eine Affinität zu Arginin und seinen Derivaten, sowie für basische Aminosäuren erwartet. *R. Zadnard* zeigte schon mit dem Calix[4]arentetraphosphonat **80**, welches in Stearinsäuremonoschichten eingelagert werden konnte, eine Erkennung von Argininpeptiden und basischen Proteinen. So wurden 0.13 eq. **80** in eine Monoschicht über einer wässrigen Subphase mit  $10 \text{ }\mu\text{M}$  Diarginin untersucht, wobei eine Flächenaufweitung von  $4 \text{ \AA}^2/\text{Molekül}$  in Wasser gemessen wurde<sup>[211, 212]</sup>.

**80**

Wie oben gezeigt, konnte der Rezeptor **11** effektiv und stabil in Stearinsäuremonoschichten eingelagert werden. Zur Untersuchung der Bindungseigenschaften in der Monoschicht wurde die Subphase mit kurzen Arginin-Peptiden (Diarginin, Triarginin und Hexaarginin) mit einer Konzentration von  $0.5\ \mu\text{M}$  für jedes Peptid versetzt. In die Monoschicht wurden für nachfolgende Experimente jeweils  $0.2\ \text{eq. 11}$  eingelagert.

Wechselwirkungen zwischen den Gästen und den eingelagerten Rezeptoren sollten eine Veränderung oder Aufweitung der Monoschicht ergeben, die im Druck-Flächendiagramm gemessen werden kann. Wird die Subphase mit  $0.5\ \mu\text{M}$  Diarginin versetzt, ergibt sich eine Flächenaufweitung um  $6\ \text{\AA}^2/\text{Molekül}$ , für Triarginin um  $8\ \text{\AA}^2/\text{Molekül}$  und für Hexaarginin um  $9\ \text{\AA}^2/\text{Molekül}$ . Ein außergewöhnliches Verhalten zeigt das kurze Tetraarginin-Peptid, welches mit einer Aufweitung von  $15\ \text{\AA}^2/\text{Molekül}$  den mit Abstand größten Effekt aller Arginin-Peptide zeigt (Abbildung 47). Mit Zugabe der Peptide verschieben sich die Kurven, hin zu größerer Fläche, was eine Wechselwirkung zwischen Rezeptor **11** und den Argininpeptiden anzeigt.



**Abbildung 47:**  $\pi$ -A-Isothermen der Einlagerung von  $0.2\ \text{eq. 11}$  in eine Stearinsäuremonoschicht über Subphasen mit  $0.5\ \mu\text{M}$  Argininpeptiden in HEPES-Puffer ( $20\ \text{mM}$ ,  $\text{pH} = 7.5$ ).

Dabei steigt die Flächenaufweitung analog der Peptidgröße, allerdings bleibt der erwartete Sprung einer noch größeren Flächenaufweitung zum Hexaarginin aus. Der größte Sprung in der Flächenaufweitung findet von reinem Puffer zum Peptid statt. In erster Linie kommt es also nicht unbedingt auf die Größe des Peptids an, sondern lediglich ob Gäste anwesend sind, oder nicht. Den größten Effekt zeigt, eigentlich unerwartet, das Tetraarginin-Peptid. Ein Rezeptormolekül **11** mit den drei BP-Rezeptoreinheiten kann aufgrund seiner Molekülgröße mit jeweils drei Diarginin-Peptiden einen 3:1-Komplex ausbilden (wie auch die Fluoreszenztitrationen mit Rezeptor **12** zeigen).

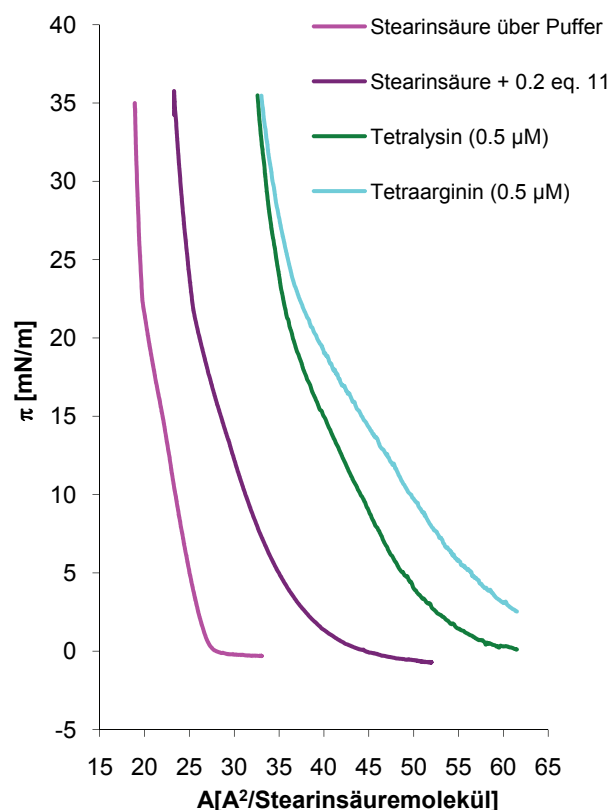
Die überstehenden Reste des Diarginins sind zu kurz, um Multipunktwechselwirkungen mit benachbarten Rezeptoren in der Monoschicht einzugehen. Das gleiche gilt für das Triarginin-Peptid, welches etwas größer ist, als das Diarginin-Peptid, und daher auch eine etwas größere Aufweitung zeigt. Auch mit dem Triarginin-Peptid bildet sich anscheinend ein 3:1-Komplex aus. Die nichtgebundenen Anteile sind anscheinend immer noch zu kurz für Multipunktwechselwirkungen. Das Hexaarginin-Peptid ist zwar viel größer, bildet aber, wie die Fluoreszenztitrationen zeigen, mit dem Cyclam-basierten System **12** einen 1:1-Komplex. Dieser Komplex wurde auch im Molecular Modelling als stabilste Einheit berechnet und zeigt eine 1:1-Struktur (siehe Abschnitt 3.3).

So ist für das Hexaarginin die Aufweitung zwar größer, als für das Tri-Peptid, aber nicht so groß, wie für das Tetra-Peptid. Auch für das Hexaarginin-Peptid werden keine Multipunktwechselwirkungen an der Monoschicht angenommen, auch wenn dies durch die Größe des Moleküls möglich wäre. Hierbei scheint sich allerdings die Bindungsstöchiometrie, hin zu einem 1:1-Komplex, zu ändern. So wird das lange Hexaarginin-Peptid komplett von den drei BP-Rezeptoreinheiten gebunden und überstehende Reste sind, wie schon beim Di- und Triarginin-Peptid nicht lang genug, um mit benachbarten Rezeptoren Multipunktwechselwirkungen zu ermöglichen.

Die außergewöhnliche Bindungsstärke des Tetraarginin-Peptids und die daraus resultierende große Flächenaufweitung der Monoschicht kann nur über Multipunktwechselwirkungen erklärt werden. Dies ist auch sinnvoll, wenn man die Ergebnisse der Fluoreszenztitrationen berücksichtigt. Hier ergab sich für das Tetraarginin-Peptid ein 2.5:1 (5:2)-Komplex. Es liegt also eine Mischung zwischen 2:1- und 3:1-Komplexen vor. Bei einem 3:1-Komplex ist der nichtgebundene Teil des Peptids

noch lang genug, um von einem zweiten Rezeptor in der Oberfläche gebunden zu werden und es ergeben sich Multipunktwechselwirkungen, die dieses nichthomologe Verhalten des Tetraarginins erklären<sup>[67]</sup>.

Dass es sich bei diesem Ergebnis nicht um einen Messfehler handelt, zeigt auch der Vergleich des Tetraarginin-Peptids mit dem Tetralysin-Peptid in Abbildung 48, wo beide Tetra-Peptide ungefähr die gleiche Größenordnung an Flächenaufweitung zeigen. Wie zu erwarten war, zeigt das Tetraarginin-Peptid noch einen größeren Effekt, da seine Guanidinium-Gruppe den besseren Gast für das Bisphosphonat-Bindungsmotiv darstellt, als die Ammonium-Gruppe des Lysins. Tetraarginin zeigt eine Flächenaufweitung um  $15 \text{ \AA}^2/\text{Molekül}$ , auf einen Wert von  $44 \text{ \AA}^2/\text{Molekül}$ , während Tetralysin eine Flächenaufweitung von  $11 \text{ \AA}^2/\text{Molekül}$ , auf einen Wert von  $40 \text{ \AA}^2/\text{Molekül}$ , ergibt (Abbildung 48).



**Abbildung 48:**  $\pi$ -A-Diagramm zum Vergleich der beiden Tetrapeptide Tetraarginin ( $0.5 \mu\text{M}$  und Tetralysin  $0.5 \mu\text{M}$ ) in 20 mM HEPES-Puffer, pH = 7.5.

Beide Tetra-Peptide zeigen damit die größte Flächenaufweitung. Sogar das eigentlich schlechter bindende Lysinpeptid zeigt noch größere Effekte, als das große Hexaarginin-Peptid. Die Tetra-Peptide haben die ideale Größe, um gerade noch höhere Komplexstöchiometrien zu erreichen, sind aber auch schon groß genug, um Multipunktwechselwirkungen mit benachbarten Rezeptoren einzugehen. Hexaarginin ist zwar groß genug für Multipunktwechselwirkungen, bildet aber 1:1-Komplexe mit dem Rezeptor **11** aus und ist groß genug, um gleichzeitig alle drei Bisphosphonate eines Rezeptorlipids zu binden. Multipunktwechselwirkungen sind somit ebenfalls wieder ausgeschlossen. Wie schon erwähnt, sind die kleinen Peptide Di- und Triarginin zu klein für Multipunktwechselwirkungen und ebenfalls zu klein für 1:1-Komplexe.

Der Vergleich zwischen Tetraphosphonatcalix[4]aren **80** von *R. Zadnard* und dem Rezeptor **11** in der Stearinsäuremonoschicht für die Bindung von Diarginin und Triarginin zeigt folgendes Ergebnis:

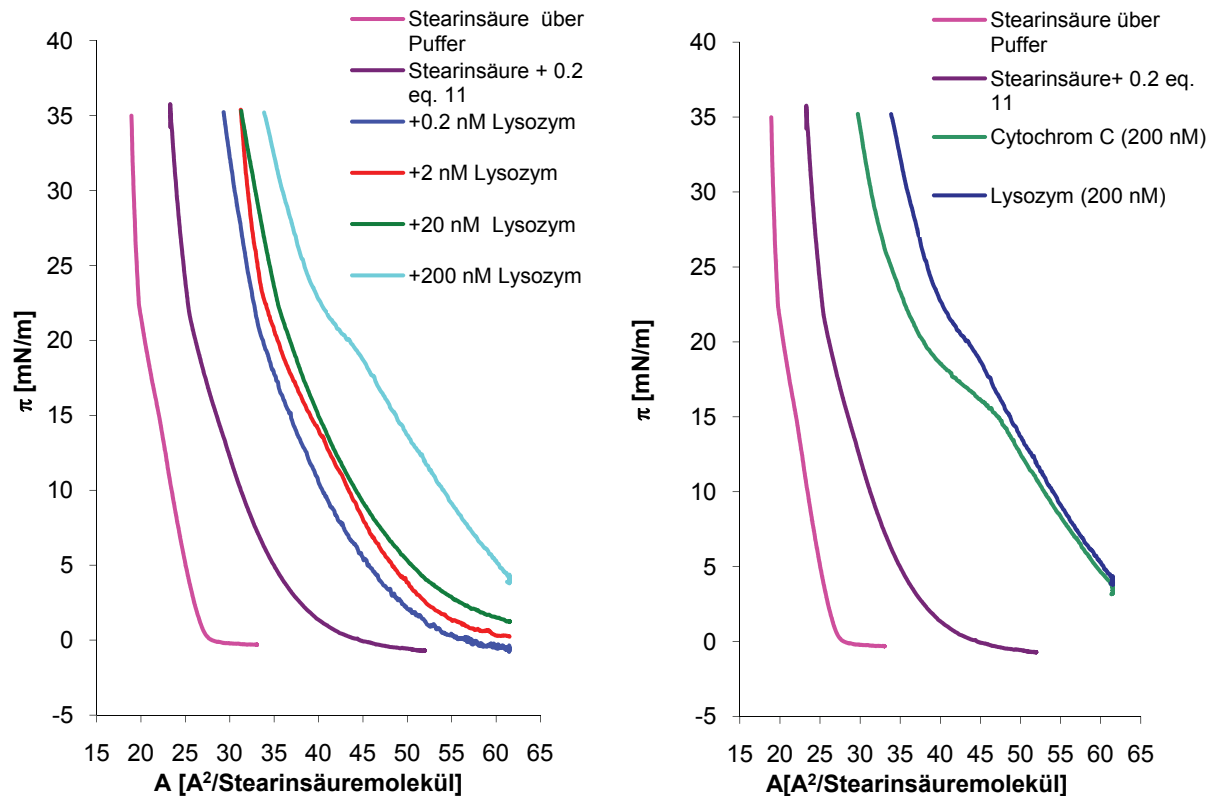
Rezeptor	Äquivalente in		$\text{\AA}^2/\text{Molekül}$	System
	Monoschicht	c (Diarginin)		
<b>11</b>	0.10	0.5 $\mu\text{M}$	6	HEPES-Puffer
<b>80</b> <sup>[211, 212]</sup>	0.13	10 $\mu\text{M}$	4	Wasser

Rezeptor	Äquivalente in		$\text{\AA}^2/\text{Molekül}$	System
	Monoschicht	c (Triarginin)		
<b>11</b>	0.10	0.5 $\mu\text{M}$	9	HEPES-Puffer
<b>80</b> <sup>[211, 212]</sup>	0.13	1 $\mu\text{M}$	10	Wasser

Diarginin zeigt mit Rezeptor **11** bei ähnlicher Dotierung der Oberfläche und 0.05 facher Peptidkonzentration eine um 1/3 größere Flächenaufweitung, als Rezeptor **80**. Dabei wurden die Messungen für **11** in gepufferter Lösung durchgeführt, während Rezeptor **80** nur in Wasser untersucht wurde. In wässriger

Lösung sollte die Bindung für **11** zu den Peptiden nochmals größer werden. Die bessere Bindungseigenschaft des Rezeptors **11**, gegenüber dem Rezeptor **80** könnte an der Größe des Rezeptors **11** liegen. Der relativ kompakte Calix[4]aren-rezeptor reicht nicht weit in die Subphase hinein und verdrängt genau so viele Stearinsäuremoleküle, wie er an Fläche einnimmt. Das Rezeptorlipid besitzt einen schmalen Lipidanker, der in etwa doppelt so groß ist, wie ein Stearinsäuremolekül. Das Cyclamgerüst mit den drei Bisphosphonat-Rezeptorarmen liegt in der Subphase und reicht unter der Monoschicht weiter. Bei Bindung von Diarginin beginnt der Gast mit der Monoschicht zu wechselwirken und verursacht die stärkere Aufweitung (Abbildung 43). Auch beim Tripeptid ist dieser Effekt noch sichtbar, wenn auch geringer. Die Flächenaufweitung und die Oberflächendotierung sind hier fast identisch, aber dafür ist die Peptidkonzentration für Rezeptor **11** immer nur noch halb so groß.

Nach der Erkennung der Peptide an der Luft-Wasser-Grenzfläche, sollte die Erkennung von basischen Proteinen, des in der Stearinsäuremonoschicht eingelagerten Rezeptors **11**, getestet werden. Als basische Proteine wurden Lysozym, als argininreiches Protein, und Cytochrom C, als lysinreiches Protein, ausgewählt. Beide Proteine weisen in etwa vergleichbare Größen und Molekulargewichte auf<sup>[16]</sup>. *R. Zadnard* zeigte schon, dass sich die Filmwaagetechnik zum Proteinnachweis in nanomolaren Konzentrationen, mittels in der Stearinsäuremonoschicht eingelagerter Rezeptoren, nachweisen lassen und dabei große Flächenaufweitungen in den  $\pi$ -A-Diagrammen zeigen<sup>[211, 212]</sup>.



**Abbildung 49:**  $\pi$ -A-Diagramme. Links: SAM mit 0.2 eq. **11** wird mit verschiedenen Konzentrationen von Lysozym (0.2 nM bis 200 nM) in der Subphase titriert. Rechts: Vergleich der basischen Proteine Cytochrom C und Lysozym (200 nM) mit 0.2 eq. **11** in 20 mM HEPES-Puffer, pH = 7.5.

Die Titration von 0.2 eq. **11** in der Stearinsäuremonoschicht mit verschiedenen Konzentrationen Lysozym (0.2 nM bis 200 nM) in der Subphase zeigt eine immer größere Aufweitung des Flächenbedarfs in den Druck-Flächen Diagrammen (Abbildung 49, links). 0.2 nM Lysozymkonzentration in der Subphase bewirkt eine Flächenvergrößerung/Molekül von  $10 \text{ \AA}^2$  auf  $39 \text{ \AA}^2/\text{Molekül}$ . Eine Erhöhung der Lysozymkonzentration um den Faktor 10, auf 2 nM, bewirkt nochmals eine Verschiebung um  $1 \text{ \AA}^2/\text{Molekül}$  auf  $40 \text{ \AA}^2/\text{Molekül}$ . Bei einer Lysozymkonzentration von 20 nM ist dann schon ein deutlicher Anstieg auf  $43 \text{ \AA}^2/\text{Molekül}$  zu verzeichnen. Die höchste gemessene Konzentration von 200 nM zeigt dann auch die größte Verschiebung der Isotherme hin zu größerem Flächenbedarf von  $21 \text{ \AA}^2/\text{Molekül}$  auf einen Wert von  $50 \text{ \AA}^2/\text{Molekül}$ . Die großen Verschiebungen hin zum großen Flächenbedarf deuten, wie schon bei den Peptiden angesprochen, auf Multipunktwechselwirkungen hin. Dies ist aufgrund der Größe von Proteinen nicht überraschend und war zu erwarten. Dass auch schon kleinste Konzentrationen im subnanomolaren Bereich so große Effekte an der Luft-Wasser-Grenzfläche zeigen, lässt die

Leistungsfähigkeit des neuen Rezeptors **11** schon erahnen, zumal hier in hoher Pufferkonzentration von 20 mM gemessen wird. und die Bindungseigenschaften zum großen Teil auf elektrostatische Wechselwirkungen zurückgeführt werden können.

Anschließend wurden die beiden basischen Proteine Lysozym und Cytochrom C bei gleicher Konzentration von 200 nM verglichen. Das argininreiche Lysozym bewirkt in dieser Konzentration in der Subphase eine Flächenaufweitung von  $21 \text{ Å}^2/\text{Molekül}$  auf  $50 \text{ Å}^2/\text{Molekül}$ , während das lysinreiche Cytochrom C eine Aufweitung um  $15 \text{ Å}^2/\text{Molekül}$  auf  $44 \text{ Å}^2/\text{Molekül}$  zeigt (Abbildung 49, rechts).

Auch hier bestätigt sich das Ergebnis des Vergleichs der beiden Tetra-Peptide Tetraarginin und Tetralysin. Der Rezeptor bindet bevorzugt Argininderivate, während die Bindung von Lysinderivaten auch sehr stark erfolgt, aber nicht so ausgeprägt ist, wie für Arginin. Dies lässt sich besonders am Vergleich der Tetrapeptide wie auch von Lysozym und Cytochrom C verdeutlichen. Cytochrom C und Lysozym weisen, wie schon in Tabelle 1 erwähnt, vergleichbare pI-Werte, Molekulargewichte und Oberflächengrößen auf. Auch in der Nettoladung sind die beiden Proteine vergleichbar. Dass die Effekte auf der Monoschicht für Lysozym etwas stärker ausfallen, als für Cytochrom C, liegt nur an der unterschiedlichen Oberflächenbeschaffenheit durch die unterschiedliche Anzahl der Argininreste. Der Bisphosphonaterezeptor **11** bindet Arginin und seine Derivate, als Peptide oder als Reste auf der Proteinoberfläche, besser als vergleichbare Lysinderivate.

Weitere Messungen mittels der Filmwaagetechnik mit Phosphatidylcholinen, wie DMPC (Dimyristoylphosphatidylcholin) oder DPPC (Dipalmitoylphosphatidylcholin) als Monoschichten wurden getestet, lieferten aber keine zufriedenstellende Einlagerung des Rezeptors **11** auf der Monolage, durch den großen Oberflächendruck schon bei kleinsten Konzentrationen. Es waren auch keine sauberen Phasenübergänge mehr erkennbar. Deswegen wurde als SAM nur mit Stearinsäure gemessen. Der Versuch den HEPES-Puffer durch Phosphatpuffer (PBS) auszutauschen, führte ebenfalls nicht zur Verbesserung der Messergebnisse, sondern ließ den Oberflächendruck der Stearinsäure alleine schon so extrem ansteigen, dass Wechselwirkungen zwischen Monoschicht und Puffer nicht ausgeschlossen werden konnten. Da dies für HEPES-Puffer eindeutig ausgeschlossen werden konnte, wurden alle Messungen mit HEPES-Puffer (20 mM, pH = 7.5) durchgeführt.



### 3.4 Fluoreszenzmessungen

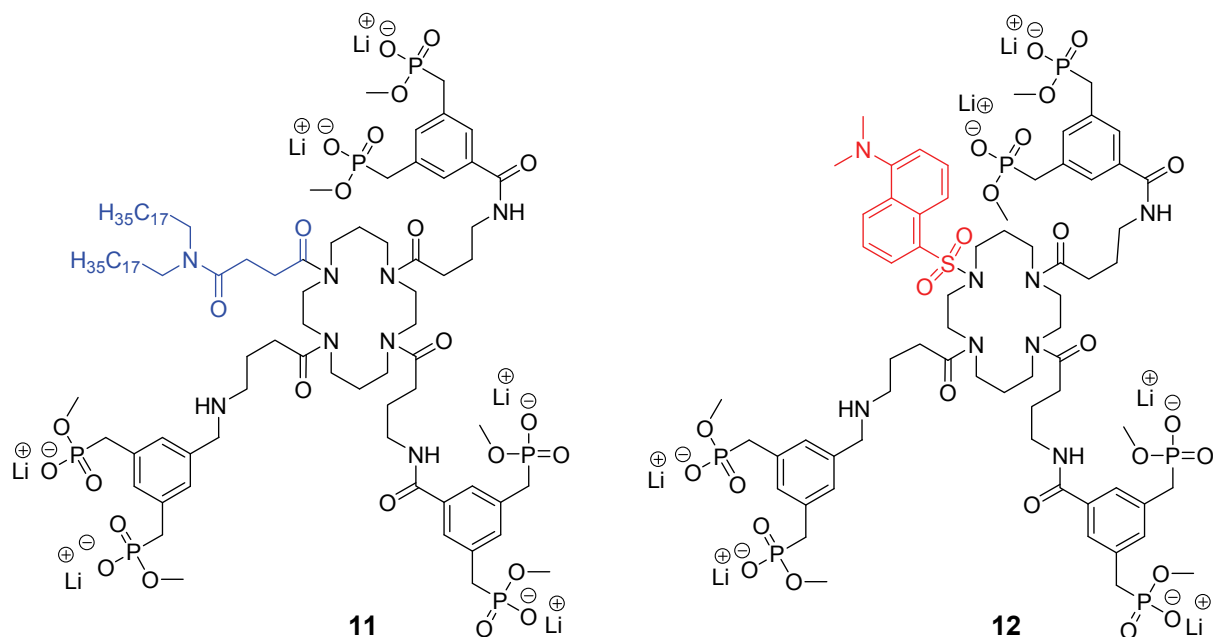
Bei der Fluoreszenztitration handelt es sich um eine empfindliche Messmethode zur Bestimmung von Bindungseigenschaften in Lösung. Dabei wird die Konzentration des Rezeptors **12** konstant gehalten und das in der Rezeptorlösung gelöste Peptid oder Protein zum vorgelegten Fluoreszenzrezeptor **12** zutitriert. Das Fluoreszenzspektrum (460-620 nm) wird bei einer definierten Anregungswellenlänge (330 nm für den Dansylfluoreszenzmarker) aufgenommen und der Wert für das Emissionsmaximum bei 544 nm zur Auswertung der Titration herangezogen. Nach jedem Titrationsschritt wird die Lösung für 3 min. inkubiert, bevor ein neues Emissionsspektrum aufgenommen wird. Die dabei auftretende Intensitätsänderung am Emissionsmaximum  $\Delta I_{\text{obs}}$  wird durch die Bildung eines Rezeptor-Substrat-Komplexes hervorgerufen und steht mit der Assoziationskonstante wie folgt in Verbindung:

$$\Delta I_{\text{obs}} = \frac{\Delta I_{\text{obs}}}{[S]_0} \cdot \left( \frac{1}{2} \left( [R]_0 + [S]_0 + \frac{1}{K_a} \right) - \sqrt{\frac{1}{4} \left( [R]_0 + [S]_0 + \frac{1}{K_a} \right)^2 - ([R]_0 [S]_0)} \right)$$

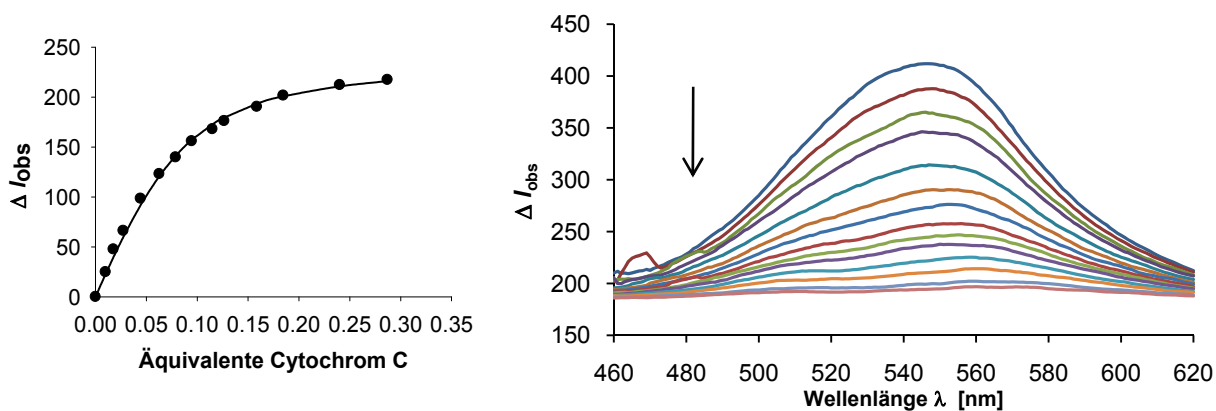
(Gleichung 3)

Zur Bestimmung der Assoziationskonstante  $K_a$  werden die erhaltenen Wertepaare  $\Delta I_{\text{obs}}$  und das Verhältnis der Ausgangskonzentrationen von Rezeptor und Protein/Peptid nach Gleichung 3 mit der *SigmaPlot 10.0-Software*<sup>[213]</sup> unter Annahme eines 1:1-Komplexes mittels nichtlinearen Regressionsmethoden an die Bindungsisotherme angepasst.<sup>[214, 215]</sup> Die Komplexstöchiometrien werden aus Job-Plot-Analysen erhalten<sup>[216]</sup>.

Die Fluoreszenzmessungen wurden in 20 mM HEPES-Puffer (150 mM NaCl, pH = 7.5) mit dem zum Rezeptorlipid **11** analogen dansylmarkierten Fluoreszenzrezeptor **12** durchgeführt. Diese beiden Systeme unterscheiden sich hinsichtlich des Rezeptoraufbaus nicht, sondern lediglich in dem Lipidanker und dem Dansyl-Label. Die Bindungseigenschaften von **12** in Lösung sollten so mit denen des in der Lipiddoppel- oder Lipidmonoschicht eingelagerten Rezeptors **11** vergleichbar sein und sich nur durch das unterschiedliche Umgebungsmedium unterscheiden.



Sowohl mit kurzen Oligoarginin-Peptiden als auch mit basischen Proteinen können nur schwache Effekte auf die spektroskopischen Eigenschaften des in den Rezeptor integrierten Fluoreszenzmarkers festgestellt werden. Es kommt, bis auf eine Ausnahme, immer zur Verstärkung der Emission während der Komplexbildung. Lediglich bei Cytochrom C sind starke Effekte bis zur vollständigen Quenchung der Fluoreszenz zu beobachten. Dies liegt am FRET-Effekt zwischen dem Dansyl-Fluoreszenzlabel und der Häm-Gruppe des Cytochrom C (Abbildung 50) <sup>[217]</sup>.



**Abbildung 50:** Rechts: Fluoreszenzemissionsspektrum der Titration von **12** mit Cytochrom C. Links: Aus der Titration resultierende Titrationskurve mit durch nichtlinearer Regression erhaltener Bindungskurve.

Die Ergebnisse der Fluoreszenztitrationen mit kleinen Oligoarginin-Peptiden und dem Tetralysin sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

**Tabelle 2:** Mittels Fluoreszenztitrationen erhaltene Bindungskonstanten  $K_a$  des Rezeptors **12** mit Peptiden.

Peptid	pI	MW	Stöchiometrie	$K_a$
		[kDa]	Peptid : 12	[M <sup>-1</sup> ]
<b>Arg<sub>2</sub></b>	12	0.3	3:1	$2.61 \cdot 10^4 (\pm 20 \%)$
<b>Arg<sub>3</sub></b>	12	0.5	3:1	$1.05 \cdot 10^4 (\pm 12 \%)$
<b>Arg<sub>4</sub></b>	12	0.6	5:2	n.b.
<b>Arg<sub>6</sub></b>	12	1.0	1:1	$1.05 \cdot 10^5 (\pm 11 \%)$
<b>Lys<sub>4</sub></b>	10	0.6	5:2	$8.35 \cdot 10^4 (\pm 14 \%)$

n.b. = nicht berechnet

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle Peptide in HEPES-gepufferter, physiologischer Kochsalzlösung Bindungskonstanten in der gleichen Größenordnung von  $10^4 \text{ M}^{-1}$  aufweisen. Lediglich das Hexaarginin-Peptid bindet eine Größenordnung stärker, nämlich  $10^5 \text{ M}^{-1}$ . Auffällig dabei ist, dass die kleineren Peptide, wie Diarginin und Triarginin, einen 3:1-Komplex bilden. Das bedeutet, dass jedes Bisphosphonat des Rezeptors **12** ein eigenes Peptid bindet. Die kleinen Peptide sind anscheinend zu klein um gleichzeitig von mehr als einer BP-Bindungseinheit eines Rezeptors gebunden zu werden. Beim Tetraarginin, welches die gleiche Bindungsstöchiometrie aufweist wie das Tetralysin, liegt ein 5:2-Komplex vor. Im Schnitt werden also jeweils zwei oder drei Peptide pro Rezeptor gebunden. Es können teilweise zwei BP-Einheiten eines Rezeptors gleichzeitig ein Tetrapeptid binden, oder aber ein zweiter Rezeptor am Ende des Peptids angreifen. Beim Tetraarginin kann allerdings keine Bindungskonstante berechnet werden, da die Bindungskurve keine Auswertung zulässt. Allerdings war es möglich mittels Job-Plot Analyse die Komplexstöchiometrie zu bestimmen. Es kann aber angenommen werden, dass die Assoziationskonstante auch für das Tetraarginin im ähnlichen Bereich, wie für das Tetralysin liegt, aber noch kleiner sein wird als für das Hexaarginin.

Mit abnehmender Komplexstöchiometrie, also hin zum 1:1-Komplex, sollte die Assoziationskonstante ansteigen, da ein Peptid dann nicht mehr von nur einem, sondern von zwei bis drei BP gebunden werden kann. Dieses wird einerseits durch fast gleiche Assoziationskonstanten zwischen Di- und Triarginin im 3:1-Komplex und der größten Assoziationskonstante im 1:1-Komplex für das Hexaarginin bestätigt. Wie schon erwähnt, fügt sich das Tetralysin passend in diese Reihe ein und sollte dabei vom Tetraarginin komplettiert werden.

Für die Fluoreszenztitrationen des Rezeptors **12** mit Proteinen, wurde sich auf eine kleine Auswahl beschränkt. Hauptsächlich wurden basische Proteine und zum Vergleich zwei saure Proteine untersucht.

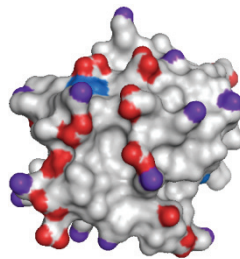
**Tabelle 3:** Mittels Fluoreszenztitrationen erhaltene Bindungskonstanten  $K_a$  des Rezeptors **12** mit Proteinen.

Proteine	pI	MW [kDa]	Stöchiometrie Protein : 12	$K_a$ [M <sup>-1</sup> ]
<b>Histon H3</b>	11.5	15.3	1:6	$2.95 \cdot 10^4$ ( $\pm 12$ %)
<b>Cytochrom C</b>	9.2	12.3	1:10	$9.41 \cdot 10^4$ ( $\pm 13$ %)
<b>Lysozym</b>	9.1	14.5	1:1	$1.25 \cdot 10^5$ ( $\pm 10$ %)
<b>Chymotrypsin</b>	8.5	25.3	1:1	$3.05 \cdot 10^3$ ( $\pm 9$ %)
<b>Trypsin</b>	8.3	23.8	n.b.	n.b.
<b>Proteinase K</b>	7.7	28.9	1:1	$6.74 \cdot 10^3$ ( $\pm 12$ %)
<b>BSA</b>	5.8	66.0	1:1	$4.78 \cdot 10^4$ ( $\pm 15$ %)
<b>ADH</b>	5.6	141.0	n.b.	n.b.

n.b. = nicht berechnet

Die Bindungskonstanten für die titrierten Proteine liegen im gleichen Größenordnungsbereich, wie für die Peptide, zwischen  $10^5$  und  $10^3$  M<sup>-1</sup>. Die größten Affinitätskonstanten wurden für Lysozym und Cytochrom C bestimmt. Dabei ist die  $K_a$  des Lysozyms erwartungsgemäß geringfügig größer, als für das Cytochrom C, was die Ergebnisse der Filmwaagemessungen nochmals bestätigt. Beide Proteine weisen eine hohe Anzahl positiver Ladungen auf der Oberfläche auf (Abbildung 36) und damit auch eine große Anzahl basischer Aminosäuren (Abbildung 35). Überraschend ist hingegen der Unterschied in der Komplexstöchiometrie, wonach beim Lysozym

ein 1:1-Komplex vorliegt und beim Cytochrom C ein 1:10-Komplex, wobei zehn Rezeptormoleküle **12** an ein Cytochrom C-Molekül binden. Da Lysozym und Cytochrom C beide ungefähr eine vergleichbare Oberfläche aufweisen, war dieses Ergebnis so nicht zu erwarten. Dies kann damit erklärt werden, dass beim Cytochrom C die basischen Aminosäuren auf der Oberfläche ziemlich gleichmäßig verteilt sind und an exponierten Positionen auf der Oberfläche liegen, womit sie für den Rezeptor gut zugänglich sind. Außerdem liegen die sauren Aminosäuren, die nicht mit dem Rezeptor wechselwirken, sondern aufgrund der negativen Ladung abstoßend wirken und einer Bindung entgegenwirken, auf der Oberfläche ziemlich konzentriert an einer Seite (Abbildung 51). Bei 18 positiven Ladungen auf der Oberfläche werden bei einem 1:10-Komplex wahrscheinlich nahezu alle basischen Aminosäuren durch den Rezeptor gebunden. Dabei können aber nicht alle drei BP-Einheiten des Rezeptors binden, sondern im Durchschnitt zwei.



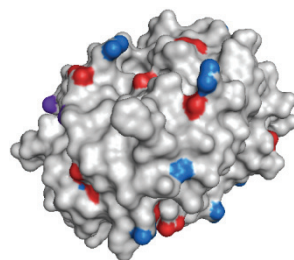
**Abbildung 51:** Kristallstruktur mit saurer Domäne von Cytochrom C, rot: saure Aminosäuren, blau und lila: basische Aminosäuren.

Beim Lysozym ist die Erklärung eines 1:1-Komplexes nicht ganz ersichtlich, da viele Arginin-Reste auf der Oberfläche gut zugänglich sind. Ebenfalls sind die basischen Aminosäuren gleichmäßig verteilt und Lysozym besitzt weniger negative Ladungen auf der Oberfläche. Die vorhandenen negativen Ladungen sind ebenfalls statistisch auf der Oberfläche verteilt und es gibt keine sauren Domänen, wie beim Cytochrom C. So kann die Bindung zu Argininen auf der Oberfläche durch abstoßende Wechselwirkungen durch die Nähe zu sauren Aminosäuren auf der Oberfläche aufgehoben werden.

Die Oberfläche für Histon H3 ist ebenfalls sehr positiv und es besitzt noch eine negative Ladung weniger, als das Lysozym. Aus der visualisierten Kristallstruktur ist die Blaufärbung der Oberfläche und damit die Häufung von basischen Aminosäuren

gut zu erkennen (Abbildung 37). Die vergleichbare Größe des Histons mit dem Lysozym und Cytochrom C lässt einen 1:6-Komplex als realistisch erscheinen. Es ist nicht überraschend, dass diese drei Enzyme auch die größten Affinitätskonstanten zum Rezeptor **12** aufweisen, da sie auch die basischen sind und somit viele Bindungsstellen für den Rezeptor auf der Oberfläche aufweisen. Die große Bindungskonstante von dem sauren Enzym BSA hingegen überrascht. Auf der Oberfläche wird eine große Anzahl von negativen Ladungen präsentiert (82), aber durch die Größe des Enzyms, besitzt es auch eine große Oberfläche, auf der auch 63 positive Ladungen vorhanden sind. Bei der Größe des BSA ist die Bildung eines 1:1-Komplexes in Lösung möglich, da auch mal einige wenige (3-4) basische Aminosäuren konzentriert und von sauren Aminosäureresten isoliert auf der Oberfläche vorkommen (Abbildung 37). Bei dieser Annahme kann aber nur die Kristallstruktur des HSA zu Grunde gelegt werden, da für das BSA keine Kristallstruktur existiert, wie bereits erwähnt.

Die Bindungskonstanten von Proteinase K und Chymotrypsin ( $K_a = 10^3 \text{ M}^{-1}$ ) liegen eine Größenordnung unter den bereits genannten Werten. Proteinase K, ein fast neutrales Enzym mit einem pI-Wert von 7.7 weist ein fast ausgewogenes Verhältnis zwischen basischen und sauren Aminosäuren auf der Oberfläche auf (Abbildung 36). Die basischen Aminosäuren haben in der Nachbarschaft auch immer negativ geladene Aminosäuren (Asp, Glu), die eine stärkere Bindung verhindern (Abbildung 52). Die Bindungskonstante liegt so im erwarteten Rahmen.

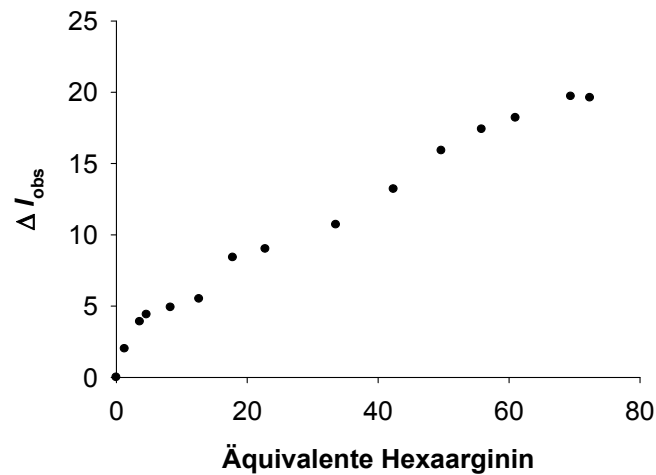


**Abbildung 52:** Visualisierte Kristallstruktur von Proteinase K, rot: Saure Aminosäuren, blau und lila: Basische Aminosäuren.

Auch das Chymotrypsin weist, trotz des basischen pI von 8.5, ein fast ausgewogenes Verhältnis zwischen basischen und sauren Aminosäuren auf der Oberfläche auf, weswegen die Bindungseigenschaften zum Rezeptor **12** ähnlich wie für Proteinase K

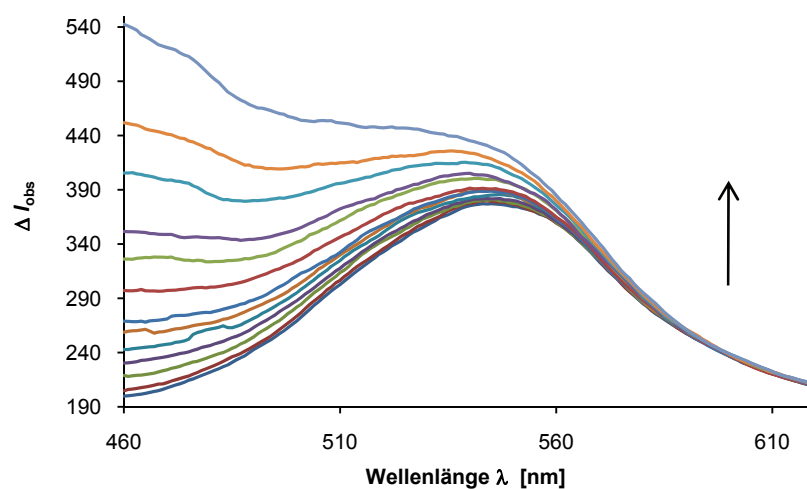
sein sollten, was im Experiment auch bestätigt werden konnte. Auch Proteinase K und Chymotrypsin bilden 1:1-Komplexe aus, wobei wahrscheinlich alle drei BP-Einheiten von **12** drei zusammenliegende Arginine oder Lysine auf der Proteinoberfläche binden. Die kleinsten und basischsten Proteine werden erwartungsgemäß von dem Fluoreszenzrezeptor **12** am stärksten gebunden, während die nur leicht basischen und fast neutralen Proteine mittelmäßig gebunden werden können. Eine Auswertung der Titrationskurven mit den Proteinen ADH und Trypsin war nicht möglich, da keine auswertbaren Titrationskurven erhalten wurden. Bei ADH steigt zwar die Fluoreszenzemission an, aber es wird keine hyperbolische Kurve erhalten. Das könnte am neu entstehenden Fluoreszenzmaximum jenseits von 460 nm liegen, welches weiter unten besprochen wird. Bei Trypsin ist kein einheitlicher Anstieg der Fluoreszenzemission zu messen. Die Fluoreszenzemission steigt oder fällt uneinheitlich zwischen den einzelnen Titrationschritten.

Auffällig, sowohl für die Titrationskurven mit Peptiden, als auch mit Proteinen, ist der weitere Anstieg der Fluoreszenzemission bei weiterer Zugabe von Protein/Peptid. Bei höheren Stöchiometrien (6-15 Äquivalente Protein/Peptid), steigt die Fluoreszenz nochmal weiter an, obwohl vorher ein Plateau erreicht wurde (Abbildung 53). Auffällig ist dabei, dass sich dieser Effekt für alle Proteine/Peptide gleich verhält, und dass jeweils noch zwei Plateaus erreicht werden. Es gibt also in jeder Titrationskurve drei Plateaus, was mit dem Vorhandensein von drei BP-Bindungsmotiven in jedem Rezeptormolekül zusammenhängen könnte. Es scheinen sich hier höhere Aggregate zu bilden, die zudem die Bindungsstöchiometrie bei hohen Äquivalenten Peptid/Protein verändern könnten. Da dieses Verhalten aber nicht genau geklärt werden kann, wird für die Auswertung der Titrationskurven nur der erste Schritt, bis zum Erreichen des ersten Plateaus, berücksichtigt.



**Abbildung 53:** Bindungskurve von Hexaarginin und Rezeptor **12** mit 3 Plateaus bei sehr hohen Stöchiometrien Hexaarginin.

Eine weitere Auffälligkeit ist das Auftreten eines neuen Fluoreszenzmaximums jenseits der 460 nm, bei einer unveränderten Anregungswellenlänge von 330 nm, bei den Proteinen BSA, Histon H3, Proteinase K und ADH (Abbildung 54). Dieses neue Maximum ist auf das Vorhandensein der Aminosäure Tryptophan (Trp) auf den Proteinoberflächen der genannten Proteine zurückzuführen. Tryptophan kann bei der genutzten Anregungswellenlänge mit dem Dansyllabel einen FRET-Effekt eingehen, wodurch das neue Maximum entsteht. Dabei wirkt die Aminosäure Trp als Energiedonator und das Dansyllabel als Energieakzeptor<sup>[218]</sup>.



**Abbildung 54:** Fluoreszenzemissionsspektrum der Titration von **12** mit ADH, Bildung eines neuen Fluoreszenzmaximums jenseits von 460 nm.



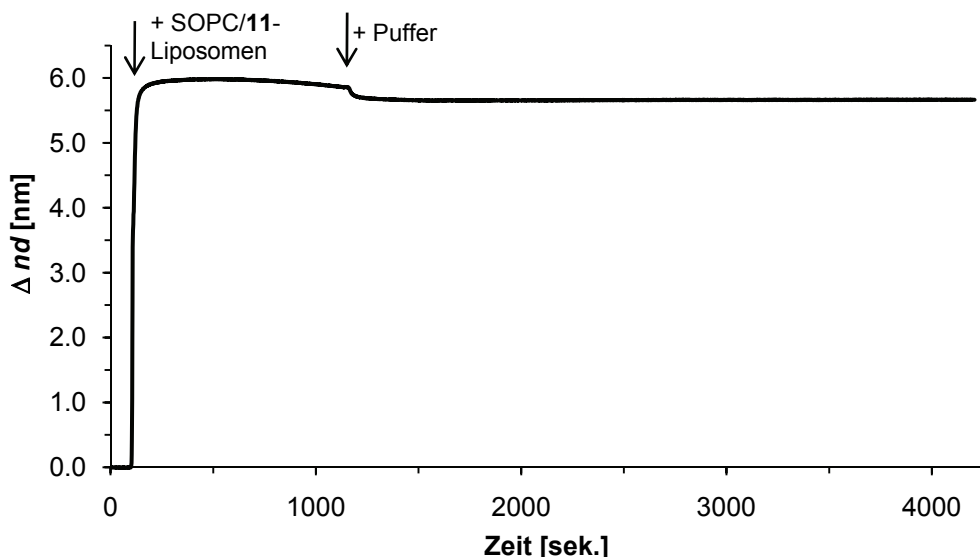
### 3.5 RlfS-Messungen

Von großem Interesse in der Nanotechnologie, sowie in der biomedizinischen Forschung ist es, Proteine auf Oberflächen in bioaktivem Zustand immobilisieren zu können. Dazu wurden in den letzten Jahren einige multivalente Bindungssysteme auf Oberflächen mit den in der Einleitung bereits erwähnten verschiedenen optischen Sensoren untersucht<sup>[27, 28, 67, 219-221]</sup>.

In dieser Arbeit wurde die Rlf-Spektroskopie zur Untersuchung des Rezeptorlipids **11** eingesetzt. Dazu wurde auf einem Glasträger eine Lipiddoppelschicht durch Vesikelspreitung (Vesikelfusion), wie sie bereits in der Einleitung beschrieben wurde, aufgebracht<sup>[139, 143, 160]</sup>.

Die Vesikelspreitung erfolgte mit kleinen unilamellaren Vesikeln in HEPES-Puffer (20 mM HEPES, pH = 7.5), die mittels Ultraschall aus 90 % des Trägerlipids (SOPC) und 10 % des Rezeptorlipids **11** bestehen und eine Gesamtlipidkonzentration von 150  $\mu$ M besitzen. Die Salzkonzentration wurde auf 1 M NaCl erhöht, um die Vesikel durch osmotischen Stress zu destabilisieren und eine Fusion auf der hydrophilen Glasoberfläche zu erleichtern.

Die zuvor in Piranha-Säure gründlich gereinigten Glasträger wurden in das Spektrometer (Durchflussapparatur) eingelegt und die Liposomenlösung durch Leitung über das Glassubstrat zur Spreitung gebracht. Dabei wird die Bildung der Lipiddoppelschicht im Sensogramm beobachtet (Abbildung 55). Die Lipiddoppelschicht sollte dabei auch beim Spülen mit Puffer (nach etwa 1200 sek.) stabil bleiben und eine optische Schichtdicke ( $\Delta nd$ ) von ca. 4 bis 6 Nanometern aufweisen. Die Funktionsweise des RlfS wurde bereits in der Einleitung ausführlich beschrieben.

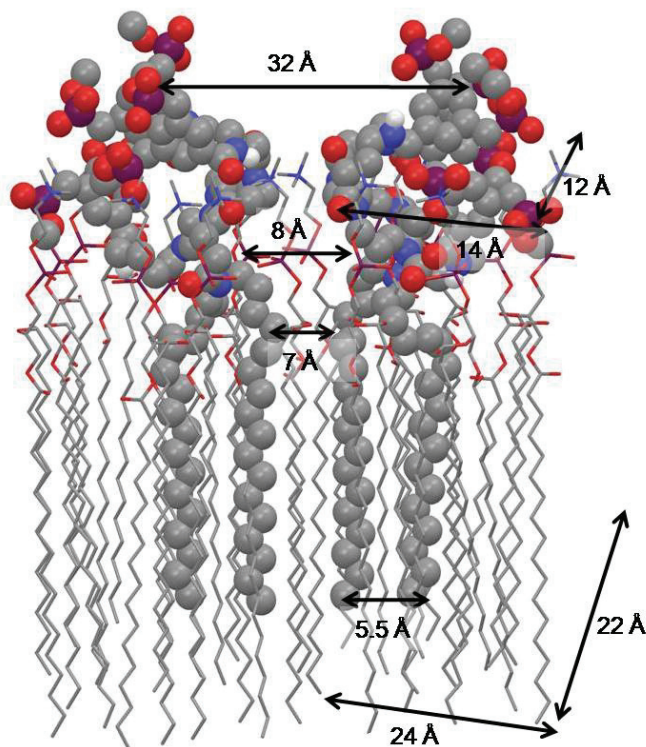


**Abbildung 55:** Vesikelfusion zur Lipiddoppelschicht aus SOPC, dotiert mit 10 % Rezeptor **11**.

Um den Dotierungsgrad der SOPC-Lipiddoppelschicht mit dem Rezeptor **11** abzuschätzen und so Aussagen über die Lipidoberflächenbeschaffenheit und die statistische Entfernung der einzelnen Rezeptormoleküle treffen zu können, wurde mittels Molecular-Modelling eine Elementarzelle aus neun SOPC-Molekülen und einem Rezeptormolekül **11** erstellt (Abbildung 56). Die Abmessungen dieser idealen Elementarzelle liegen bei  $24 \times 22 \text{ \AA}$ . Bei dieser Abschätzung wird davon ausgegangen, dass 100 % des Rezeptors **11** in das Trägerlipid SOPC (die Liposomen) eingelagert werden und kein Molekül in der wässrigen Lösung verbleibt, was wahrscheinlich nicht der Realität entspricht, da das Molekül **11** sehr gut wasserlöslich ist. Auch die Dynamik des Systems, die durch die Fluidität der Lipide bei  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  entsteht und damit die Beweglichkeit der Rezeptoren in der Lipiddoppelschicht ermöglicht, wird bei dieser Abschätzung vernachlässigt. Auch das bewegliche Cyclamgerüst, wie die temperaturabhängigen NMR-Spektren in Abbildung 19 zeigen, wurde für diese Abschätzung in einer berechneten Minimumstruktur eingefroren. Die Abmessungen der Fläche des Cyclamgerüsts mit den drei BP-Bindungseinheiten betragen  $14 \times 12 \text{ \AA}$ .

Um die Entfernung zweier Rezeptoren abschätzen zu können, werden zwei dieser Elementarzellen nebeneinander gelegt, wobei die Bindungseinheiten voneinander weg zeigen, um die maximale Entfernung der Bindungseinheiten voneinander abschätzen zu können. In diesem idealisierten, statischen System beträgt der

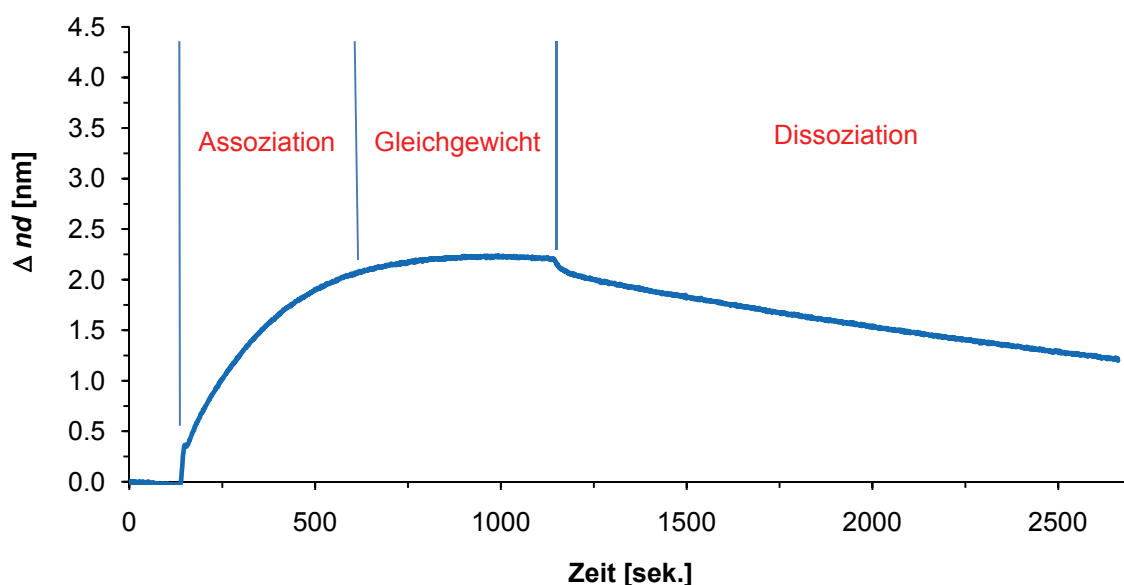
Abstand zweier Rezeptormoleküle, in einer SOPC-Lipidschicht mit 10 % Dotierungsgrad 7 Å bei den Lipidankern, 8-9 Å zwischen den Cyclamgrundgerüsten und ungefähr 32 Å zwischen den Bisphosphonatbindungseinheiten. Das bedeutet, dass die Lipidoberfläche im Idealfall ungefähr vollständig mit dem Rezeptormolekül belegt sein sollte und nicht viel Abstand zwischen den einzelnen Rezeptoren vorhanden sein sollte. Multipunktwechselwirkungen zwischen dem Protein oder Peptid mit mehreren Rezeptoren sollten so bei den RfS-Messungen auf der Lipiddoppelschicht möglich sein.



**Abbildung 56:** Molecular-Modelling zweier Elementarzellen von einer mit 10 % an Rezeptor 11 dotierten SOPC-Lipidschicht.

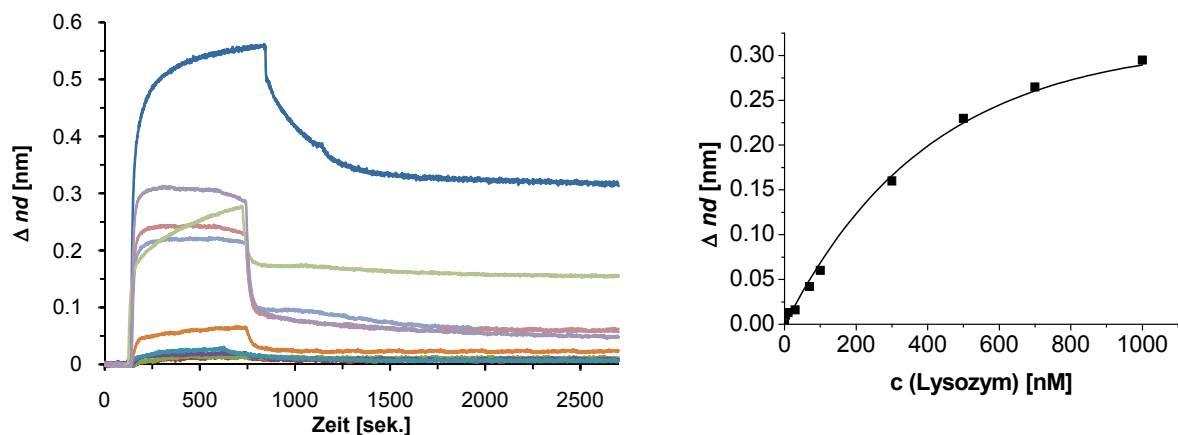
Auf dieser mit dem Rezeptor 11 dotierten Lipidschicht können nun die Wechselwirkungen mit den einzelnen Proteinen untersucht werden. Dazu werden Proteinstammlösungen in HEPES-Puffer (20 mM, 150 mM NaCl, pH = 7.5) angesetzt und die Proteine in gleichen Konzentrationen zwischen 3 nM bis 1 µM über die Lipidschicht geleitet. Als Laufpuffer wird dabei physiologischer HEPES-Puffer (20 mM) mit Zusatz von 150 mM NaCl benutzt. Bei Beginn der Injektion der Proteinlösung beginnt die Assoziationsphase der Proteine an die rezeptordotierte

Lipidoberfläche, was an dem Anstieg (der Zunahme) der optischen Schichtdicke erkennbar wird. Die Zunahme der optischen Schichtdicke ist proportional zur Adsorption an organischem Material (Protein/Peptid). Nach der Assoziationsphase, wenn kein weiterer Anstieg der optischen Schichtdicke mehr zu beobachten ist, d.h. die Bindungsamplitude im RfS-Signal ein Plateau erreicht, schließt sich die Gleichgewichtsphase an. Die Anzahl der auf der Oberfläche gebundenen Proteine bleibt konstant. Nachdem das komplette Volumen der Proteinlösung über den Glasträger und die darauf befindliche mit dem Rezeptor dotierte Lipiddoppelschicht gespült wurde, wird mit der gleichen Flussrate, wie bei der Injektion, Puffer über den Glasträger geleitet. Es beginnt die Dissoziationsphase, die bei einer reversiblen Bindung aus der Abnahme der optischen Schichtdicke gekennzeichnet ist. Bei einer komplett reversiblen Bindung wird in der Dissoziationsphase das Ausgangsniveau bereits in einigen Sekunden erreicht. Bei einer teilweise irreversiblen Bindung bleibt organisches Material auf der Oberfläche auch noch für längere Zeit gebunden und das Ausgangsniveau wird entweder erst nach sehr langer Zeit des Pufferspülens oder überhaupt nicht mehr erreicht. Bei komplett irreversibler Bindung bleibt fast die gleiche Menge Material, wie in der Gleichgewichtsphase, auf der Oberfläche gebunden und es ist fast keine Abnahme der optischen Schichtdicke zu beobachten (Abbildung 57).



**Abbildung 57:** Typische RfS-Kurve (MBP-R10, 700 nM auf 11/SOPC 10:90) mit Erläuterung der einzelnen Phasen.

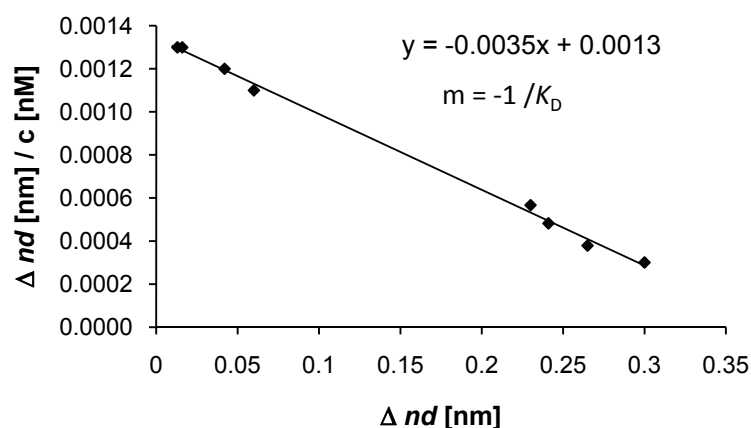
Der reversible Bindungsanteil ist gekennzeichnet durch das Plateau in der Gleichgewichtsphase und damit mit der Höhe der Bindungsamplitude. Der irreversible Bindungsanteil ist durch die Qualität und Quantität der Abnahme der optischen Schichtdicke in der Dissoziationsphase gekennzeichnet. In Abbildung 58 ist eine Titrationskurve von Lysozym auf SOPC/**11** gezeigt. Die Bindung des Lysozyms an das Rezeptorlipid **11** ist gekennzeichnet durch einen Teil reversibler Bindung, aber auch zum großen Teil durch einen irreversiblen Bindungsanteil.



**Abbildung 58:** Bindung von Lysozym auf mit **11** dotierter SOPC-Lipiddoppelschicht. Links: RfS-Bindungskurve bei unterschiedlichen Lysozymkonzentrationen (3 nM-1  $\mu$ M) mit reversiblen und starkem irreversiblen Bindungsanteil. Rechts: Aus dem reversiblen Bindungsanteil resultierende Titrationskurve.

Aus dem reversiblen Bindungsanteil kann eine Titrationskurve erstellt werden (Abbildung 58, rechts), aus der mit nichtlinearen Regressionsmethoden eine Bindungskonstante nach *Langmuir* abgeschätzt werden kann. Dies ist bei den meisten Proteinen, die in dieser Arbeit untersucht worden sind, sehr schwierig und nur mit äußerster Vorsicht möglich, da fast alle untersuchten Proteine und Peptide einen nicht unerheblichen Teil an irreversiblen Bindungsanteilen aufweisen. Die erhaltenen Werte sollten nur als grobe Näherungswerte zu sehen sein und gelten als Abschätzung der Größenordnung. Die Bindungskonstanten wurden für jedes Protein auf jeweils drei unterschiedliche Weisen ermittelt und werden nur angegeben, wenn alle Methoden ungefähr vergleichbare Ergebnisse liefern.

Die zweite Methode ist die Auswertung einer Titration mittels linearer Regression nach *Scatchard* (Scatchard-Plot)<sup>[222, 223]</sup>. Beim *Scatchard*-Plot wird auf der y-Achse die Änderung der optischen Schichtdicke ( $\Delta nd$ ) dividiert durch die Konzentration ( $c$ ) aufgetragen und auf der x-Achse die Änderung der optischen Schichtdicke ( $\Delta nd$ ) (Abbildung 59). Die erhaltenen Datenpunkte werden mit einer Ausgleichsgeraden verbunden. Aus der Steigung der Geraden kann die Dissoziationskonstante berechnet werden.



**Abbildung 59:** Abschätzung des  $K_D$  mittels linearer Regressionsmethode nach *Scatchard* (Scatchard-Plot); aus der negativen Steigung der gefitteten Ausgleichsgeraden lässt sich der  $K_D$ -Wert abschätzen.

Die dritte Methode ist die Analyse der Bindungskurve mit der *BIAevaluation*-Software von *Biacore*<sup>[224]</sup>. Die Bindungskurve wird nach dem 1:1 Bindungsmodell nach Langmuir (pseudo-erste-Ordnung-Bindungsmodell) gefittet<sup>[30, 120, 134]</sup>.

Die Gleichung für die Standard pseudo-erste-Ordnung Kinetik für die Assoziation lautet<sup>[225]</sup>:

$$R_{(t)} = R_{GGW} (1 - e^{-(k_a \times c + k_d) \times (t-t_0)}) \quad (\text{Gleichung 4})$$

Für die Dissoziation gilt die Gleichung<sup>[225]</sup>:

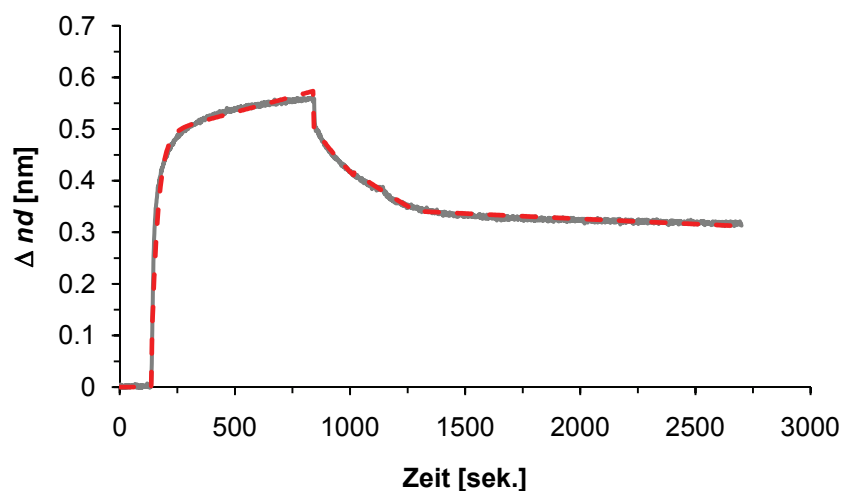
$$R_{(t)} = R_0 \times e^{-k_d \times (t-t_0)} \quad (\text{Gleichung 5})$$

Dabei ist  $R_{(t)}$  das erhaltene Signal bei der Zeit  $t$ ,  $R_{GGW}$  ist das Gleichgewichtssignal,  $R_0$  ist das Signal bei der Zeit  $t = t_0$ ,  $k_a$  und  $k_d$  sind die Assoziations- und

Dissoziationsratenkonstanten und  $c$  ist die Protein/Peptidkonzentration. Die abgeschätzten Bindungs- und Dissoziationskonstanten  $K_a$  und  $K_D$  werden gemäß Gleichung 6 und Gleichung 7 berechnet.

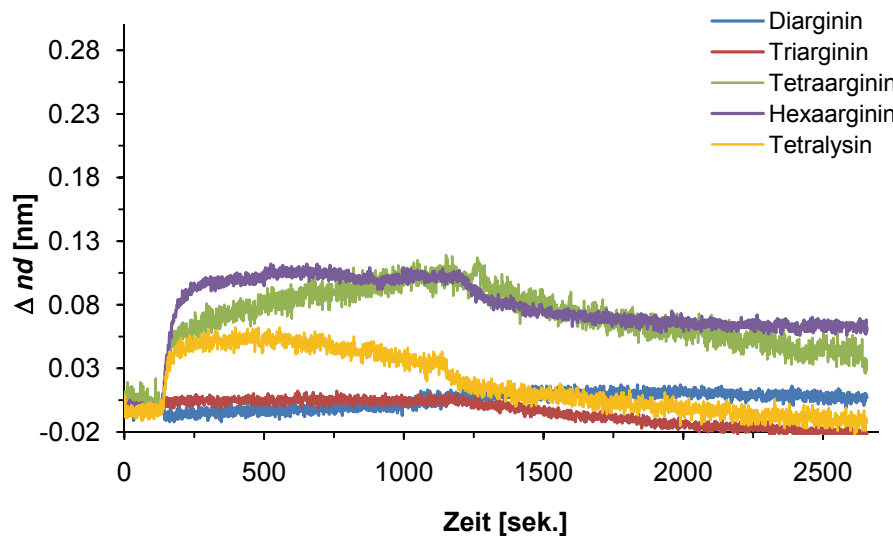
$$K_a = \frac{k_a}{k_d} \quad \text{und} \quad K_D = \frac{k_d}{k_a} \quad (\text{Gleichung 6, Gleichung 7})$$

Aus dem irreversiblen Bindungsanteil (Dissoziationsphase) wurde der Abfall der Kurve mit einem monoexponentiellen oder biexponentiellen Dissoziationsmodell (*BIAevaluation*) gefittet, um die Dissoziationsratenkonstante ( $k_d$ ) zu erhalten<sup>[27, 226]</sup>. Durch fitten der Assoziationsphase kann nach dem gleichen Prinzip die Kinetik für die Assoziation (Assoziationsratenkonstante  $k_a$ ) bestimmt werden.



**Abbildung 60:** Fit der RfS-Kurve von Lysozym 1  $\mu\text{M}$ -1 mit der BIAevaluation-Software<sup>[224]</sup>. Rot-gestrichelte Linie: Langmuir-Fit, grau: Gemessene Kurve.

Die RfS-Messungen auf einer mit 10 % von **11** dotierten SOPC-Lipiddoppelschicht liefern ein Ergebnis, welches mit den Ergebnissen aus den Filmwaagemessungen und den Fluoreszenztitrationen einhergeht. Allerdings liegen die Bindungskonstanten auf der Oberfläche um zwei bis drei Größenordnungen über denen, die mittels Fluoreszenztitrationen in Lösung ermittelt wurden. Die Messkurven für die jeweils höchste gemessene Konzentration (1  $\mu\text{M}$ ) der Peptide sind in Abbildung 61 gezeigt.



**Abbildung 61:** Höchste Konzentration ( $1 \mu\text{M}$ ) der Peptide auf **11**/SOPC 10:90 Lipiddoppelschicht.

So kann die Assoziationskonstante für das Tetraarginin-Peptid, welche in Lösung leider nicht ermittelt werden konnte, aber in einer Größenordnung zwischen Triarginin ( $1.05 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ ) und Hexaarginin ( $1.05 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ ) liegen sollte, auf der Oberfläche um mindestens zwei Größenordnungen stärker abgeschätzt werden, nämlich auf  $3 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ . Tetraarginin bindet auf der Oberfläche fast irreversibel. Tetralysin bindet am Rezeptor **11**, welcher in die Lipiddoppelschicht eingelagert ist, ebenfalls um 1.5 Größenordnungen besser, mit einer  $K_a$  von  $3.4 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ . Die stärkste Bindung auf der Oberfläche, die nahezu komplett irreversibel ist, liefert das Hexaarginin-Peptid. Trotz des hohen Anteils an irreversibler Bindung lässt sich aus dem reversiblen Bindungsanteil der Titration immer noch eine Bindungskonstante von  $2.5 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$  abschätzen (Tabelle 4).

Dies bedeutet, dass die Bindung auf der Oberfläche für das Hexaarginin um drei Größenordnungen stärker geworden ist, als in Lösung. Die enorme Zunahme der Bindungsstärke auf der Oberfläche kann zum Einen in der perfekten Ausrichtung des Rezeptorlipids auf der Oberfläche und der damit verringerten Entropie begründet sein und zum Anderen an der dichten Belegung der Oberfläche mit Rezeptorlipiden und damit mit der Ermöglichung von Multipunktwechselwirkungen erklärt werden. Dies würde auch erklären, warum die Bindungsstärke mit steigender Peptidlänge nicht gleichmäßig ansteigt, sondern für das Hexapeptid nochmal um eine Größenordnung mehr zunimmt. Das Lysinpeptid wird auf der Oberfläche um etwa eine Größenordnung schlechter gebunden, als das Tetraarginin-Peptid. Bei



vergleichbarer Größe und Ladung kann so ebenfalls, wie schon bei den Filmwaage- und den Fluoreszenzuntersuchungen gezeigt, eine stärkere Bindung des Rezeptors zu Arginin-Seitenketten festgestellt werden und die stärkere Argininselektivität des Bisphosphonatmotivs wieder bestätigt werden. Die Bindungskinetiken, die Assoziations- und Dissoziationsratenkonstanten, wurden aus dem irreversiblen Bindungsanteil bestimmt. Auch für diese Konstanten zeigt sich, dass die Bindungen für Tetraarginin und Hexaarginin sehr stark sind ( $k_d = 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ). Für das Tetralysin-Peptid liegt die Dissoziationsratenkonstante um eine Größenordnung unter der für die Argininpeptide ( $k_d = 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ). Auch dies steht im Einklang mit den Ergebnissen aus dem reversiblen Bindungsanteil.

Dass für das kleine Arginin-Dipeptid und das kleine Arginin-Tripeptid keine Bindung auf der Oberfläche gefunden und bestimmt werden konnte, liegt mit Sicherheit nicht daran, dass keine Bindung stattfindet, sondern dass die Peptide zu klein sind, um ihre Bindung auf der Oberfläche detektieren zu können. Es ist anzunehmen, dass auch hier die Assoziationskonstante für das Diarginin und das Triarginin im Bereich um  $10^6 \text{ M}^{-1}$  liegen sollte.

**Tabelle 4:** Ergebnisse der RIfS-Titrations mit Peptiden auf Lipiddoppelschichten 11/SOPC 10:90.

	pI	MW [kDa]	reversibel		irreversibel	
			$K_a$ [ $\text{M}^{-1}$ ]	$K_D$ [M]	$k_a$ [ $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	$k_d$ [ $\text{s}^{-1}$ ]
<b>Arg<sub>2</sub></b>	12	0.3	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
<b>Arg<sub>3</sub></b>	12	0.5	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
<b>Arg<sub>4</sub></b>	12	0.6	$3.0 \cdot 10^7$	$3.3 \cdot 10^{-8}$	$2.9 \cdot 10^3$	$4.6 \cdot 10^{-4}$
<b>Arg<sub>6</sub></b>	12	1.0	$2.5 \cdot 10^8$	$5.6 \cdot 10^{-9}$	$2.7 \cdot 10^4$	$3.6 \cdot 10^{-4}$
<b>Lys<sub>4</sub></b>	10	0.6	$3.4 \cdot 10^6$	$1.1 \cdot 10^{-7}$	$2.9 \cdot 10^4$	$3.4 \cdot 10^{-3}$

n. d. = nicht detektiert

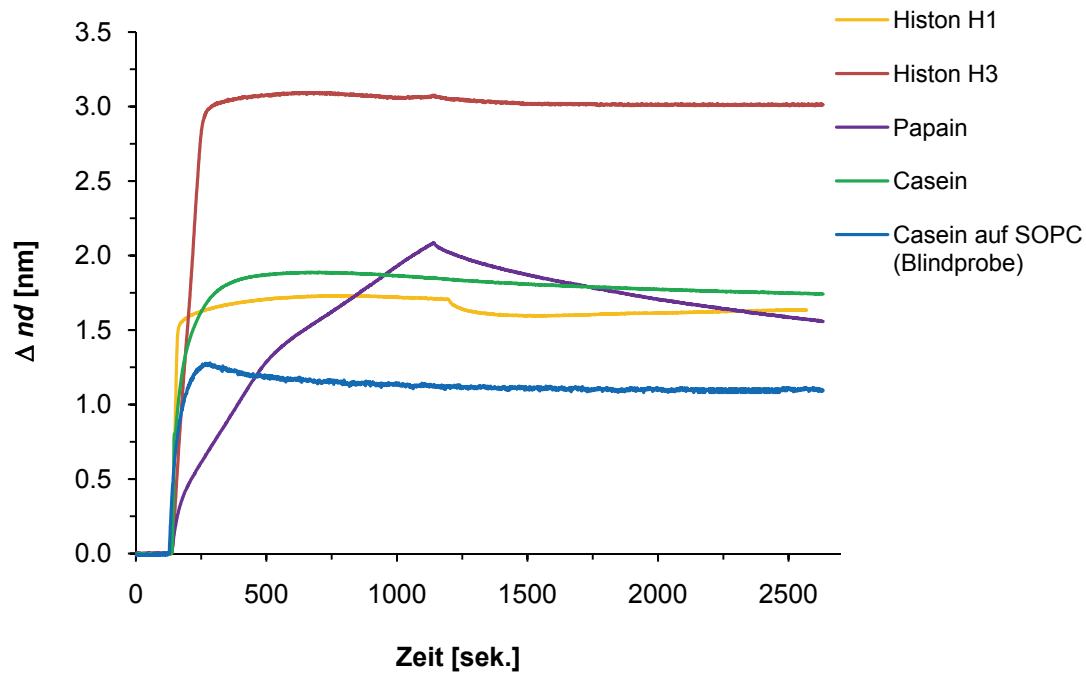
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse der unterschiedlichen Messmethoden (Filmwaage, Fluoreszenztitrations und RIfS-Messungen) für die Arginin- und Lysinpeptide übereinstimmen. Auch die *in silico* berechneten Modellierungsergebnisse für das Tetraarginin-Peptid und das Hexaarginin-Peptid stimmen mit

diesen hier gemachten Beobachtungen überein (Abschnitt 3.3). Das Tetraarginin-Peptid bindet besser, als das vergleichbare Tetralysin-Peptid. Je länger die Peptide werden, umso stabiler werden die Komplexe (Übergang von 3 Peptiden gebunden an einen Rezeptor hin zu 1:1-Komplexen). Auf der Oberfläche wird die Bindung zusätzlich, besonders für die längeren Peptide (insbesondere Hexaarginin), durch Multipunktwechselwirkungen (zwei und mehr Rezeptoren für ein Peptid auf der Oberfläche) verstärkt.

Weiterhin ist zu betonen, dass die Bindungsstudien in stark konzentrierter HEPES-gepufferter Lösung (20 mM HEPES) mit physiologischem Salzgehalt (150 mM NaCl) durchgeführt wurden. Da die Bindung zwischen Bisphosphonat-Bindungsmotiv und Arginin/Lysin-Peptiden in großem Maße auf elektrostatische Wechselwirkungen (*Coulomb*-Wechselwirkungen / ionische Effekte, Wasserstoffbrückenbindungen) zurückzuführen ist, zeigen die unter diesen Messbedingungen (20 mM HEPES, 150 mM NaCl) gefundenen Bindungskonstanten (große Assoziationskonstanten, extrem kleine Dissoziationskonstanten) das enorme Bindungspotential des Rezeptors für basische Peptide.

Als nächstes wurden RIfS-Titrationsen mit einer Auswahl von Proteinen, wie sie bereits in Abschnitt 3.2, Proteinoberflächenanalyse, vorgestellt wurden, durchgeführt.

Die titrierten Proteine können nach den Ergebnissen der Titrationsen in vier verschiedene Klassen eingeteilt werden. Die erste Klasse bilden dabei die irreversibel bindenden Proteine (Histon H3, Histon H1, Papain und Casein). Aus den RIfS-Titrationsen sind die Ergebnisse der Messung mit der höchsten Konzentration (irreversibler Anteil) in Abbildung 62 gezeigt. Die anschließenden Titrationschritte auf dem reversiblen Bindungsanteil fallen sehr klein aus, da fast alle Bindungsstellen schon besetzt sind. Auch wurde versucht, Bindungskonstanten aus dem reversiblen Bindungsanteil abzuschätzen und aus dem irreversiblen Bindungsanteil Dissoziationsratenkonstanten zu bestimmen (Tabelle 5).



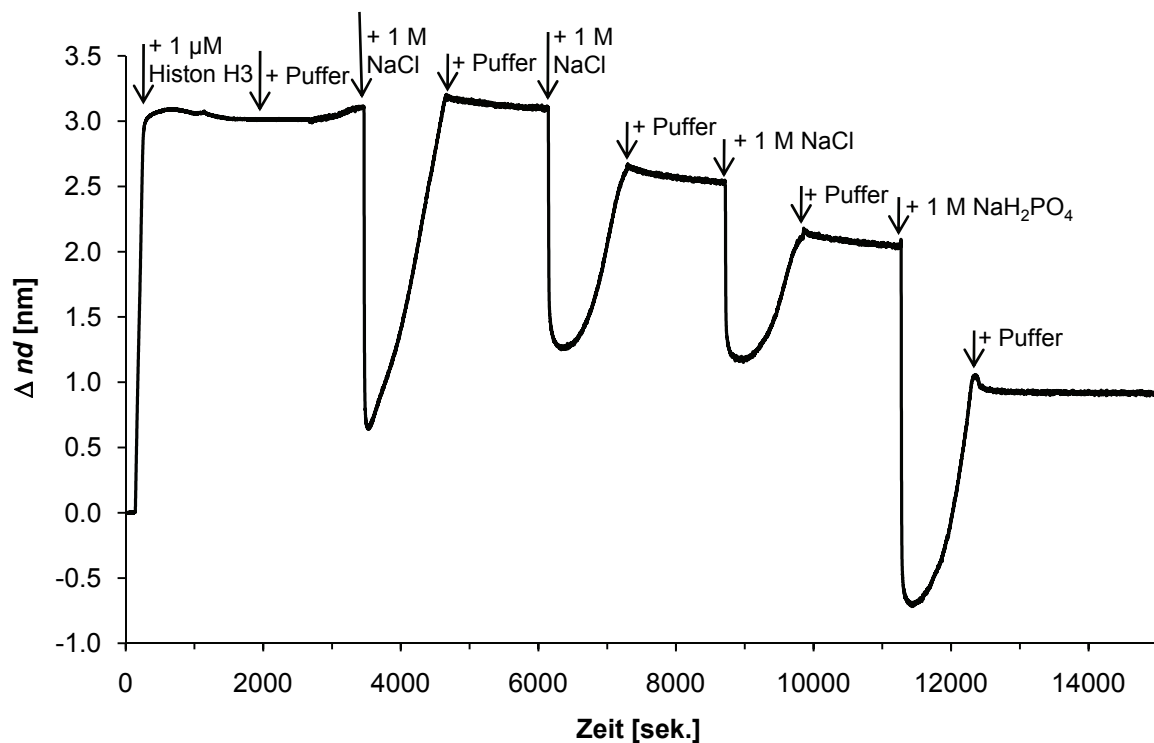
**Abbildung 62:** Irreversibel bindende Proteine mit höchster gemessener Konzentration (1  $\mu\text{M}$ ) auf **11**/SOPC 10:90 Lipiddoppelschicht.

**Tabelle 5:** Ergebnisse der RfS-Titrationsen der irreversibel bindenden Proteine auf Lipiddoppelschichten **11**/SOPC 10:90.

	pl	reversibel			irreversibel	
		MW [kDa]	$K_a$ [ $\text{M}^{-1}$ ]	$K_D$ [M]	$k_a$ [ $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	$k_d$ [ $\text{s}^{-1}$ ]
<b>Histon H3</b>	11.5	15.3	$2.7 \cdot 10^6$	$3.7 \cdot 10^{-7}$	$2.3 \cdot 10^4$	$6.8 \cdot 10^{-6}$
<b>Histon H1</b>	10.4	22.0	$4.5 \cdot 10^6$	$2.2 \cdot 10^{-7}$	$5.0 \cdot 10^4$	$4.9 \cdot 10^{-8}$
<b>Casein</b>	5.0	19.1	$9.3 \cdot 10^5$	$1.1 \cdot 10^{-6}$	$1.5 \cdot 10^4$	$5.0 \cdot 10^{-5}$
<b>Papain</b>	8.8	21.0	$2.0 \cdot 10^6$	$5.0 \cdot 10^{-7}$	$1.8 \cdot 10^3$	$1.6 \cdot 10^{-4}$

Wie erwartet binden die stark basischen und damit positiv geladenen Proteine, wie Histon H1, Histon H3 und Papain sehr stark an den immobilisierten Rezeptor **11**. Die Assoziationskonstanten von Histon H1, Histon H3 und Papain liegen alle in der gleichen Größenordnung ( $10^6 \text{ M}^{-1}$ ). Auch die Dissoziationskonstanten liegen in dem gleichen Bereich ( $10^{-7} \text{ M}$ ). Alle Proteine werden an der Oberfläche durch die große Anzahl von basischen Aminosäuren (Arginin und Lysin) gebunden.

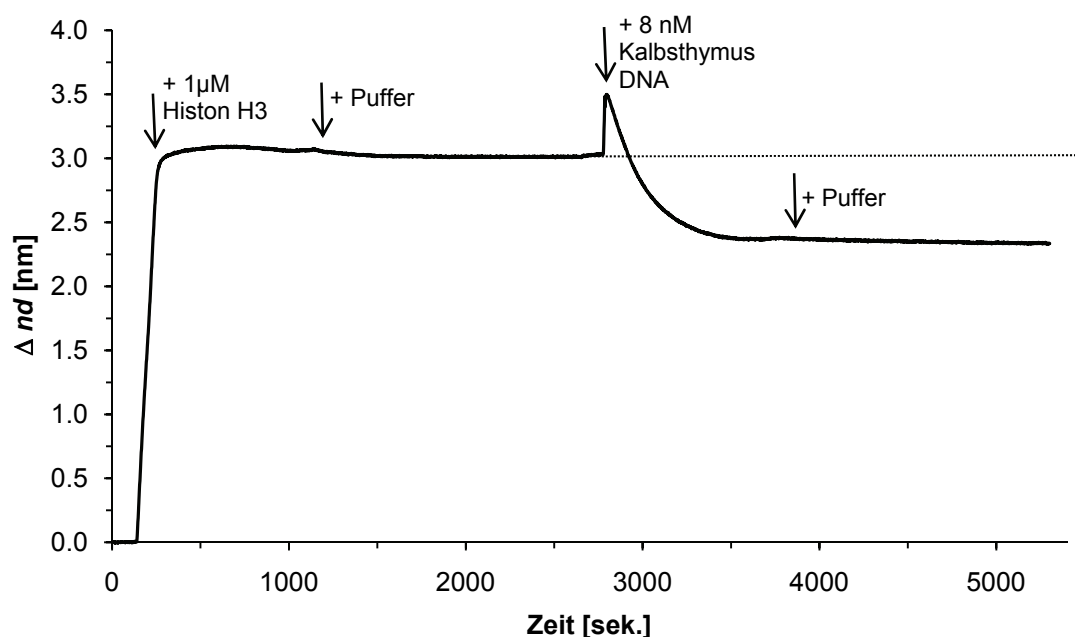
Mit dem irreversibel immobilisierten Histon H3 wurden Verdrängungsexperimente durchgeführt, um feststellen zu können, wie stark die Bindung ist. Dazu wurde dreimal hintereinander 1 M NaCl-Lösung und anschließend 1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Lösung über das gebundene Protein gespült (Abbildung 63). Die erste Spülung mit 1 M NaCl hatte keinen Effekt auf die Bindung und die gleiche Menge an Histon H3 blieb auf der Oberfläche vom Rezeptor **11** gebunden. Bei der zweiten und dritten Spülung konnte die auf der Oberfläche gebundene Proteinmenge, durch die ansteigende Ionenstärke im Lösungsmittel, verringert werden und zwar insgesamt um 1/3 der ursprünglichen gebundenen Proteinmenge. Beim letzten Spülvorgang mit  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  wurde ungefähr doppelt soviel Histon H3 von der Oberfläche gewaschen, wie mit 1 M NaCl-Lösung.



**Abbildung 63:** Histon H3 (1 μM) immobilisiert auf Rezeptor **11**, Verdrängungsversuche mit 1 M NaCl und 1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ .

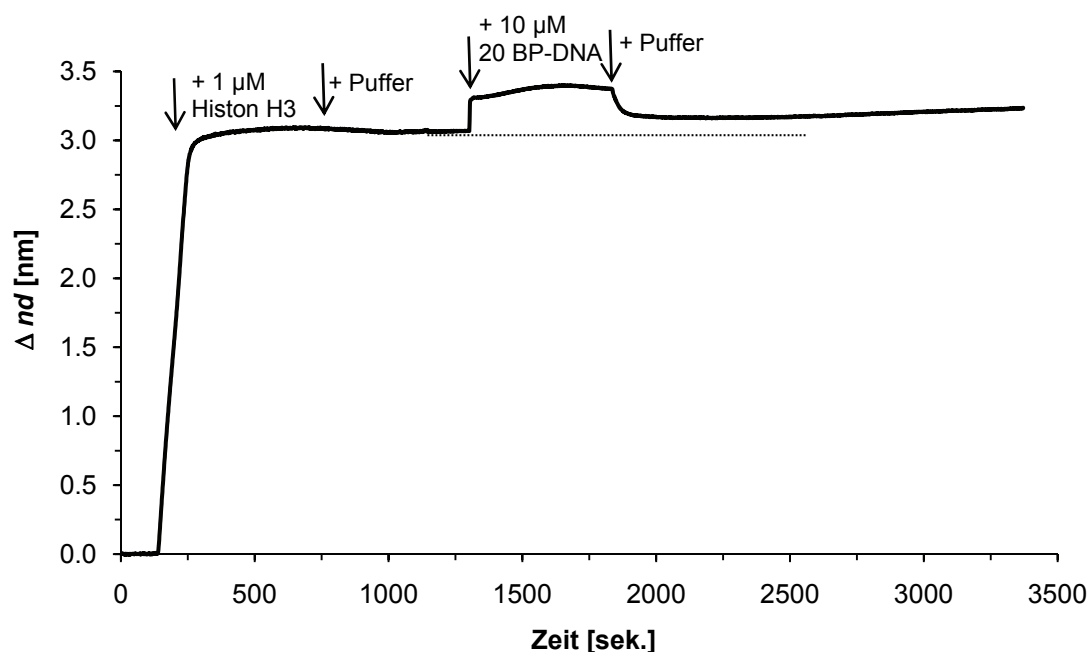
Da Histone starke DNA-Binder sind, und sich die DNA um Histone wickelt, um so ein Nukleosom zu bilden, welches die chromosomale Struktur ausbildet, wurde im nächsten Experiment die Aktivität des immobilisierten Histon H3 untersucht, indem die DNA-Bindfähigkeit des Proteins mit Kalbsthymus-DNA überprüft werden sollte (Abbildung 64). Kalbsthymus-DNA hat ein Molekulargewicht zwischen 10 und 15

Millionen Dalton (im Schnitt 12500 kDa)<sup>[227]</sup>. Pro Basenpaar wird ein mittleres Molekulargewicht von 650 Da angenommen<sup>[228]</sup>. Daraus kann abgeschätzt werden, dass die hier benutzte Kalbsthymus-DNA ungefähr 20000 Basenpaare besitzt. Da pro Basenpaar zwei negative Ladungen angenommen werden können, kann bei 8 nM Kalbsthymus-DNA von einer Ladungskonzentration von 320  $\mu\text{M}$  negativen Ladungen ausgegangen werden. Pro Molekül Histon H3 liegen 18 positive Ladungen vor. Bei einer 1  $\mu\text{M}$  Proteinkonzentration auf der Oberfläche würden theoretisch, wenn alle Seiten des Proteins zugänglich wären und auch keine positiv geladenen Aminosäureseitenketten zur Bindung am Rezeptor „verbraucht“ würden, 18  $\mu\text{M}$  positive Ladungen auf der Proteinoberfläche vorliegen. Daraus resultiert ein 18-facher Überschuss an negativen Ladungen, wenn die Kalbsthymus-DNA über das immobilisierte Histon H3 gespült wird. Nachdem eine erste Bindung der Kalbsthymus-DNA auf der Oberfläche stattfindet, die gekennzeichnet ist durch die Zunahme der optischen Schichtdicke zu Beginn der Injektion, ist die Kalbsthymus-DNA in der Lage, das gebundene Protein zu einem Sechstel der gebundenen Menge von der Oberfläche abzulösen. Die gleiche Menge Protein konnte, wie in Abbildung 63 gezeigt, erst nach dreimaligem Spülen mit 1 M NaCl-Lösung entfernt werden.



**Abbildung 64:** Histon H3 (1  $\mu\text{M}$  entspricht 18  $\mu\text{M}$  positive Ladungen), immobilisiert auf Rezeptor 11 und Zugabe von Kalbsthymus-DNA (8 nM entspricht 320  $\mu\text{M}$  negative Ladungen).

Im nächsten Experiment wurde die sehr lange Kalbsthymus-DNA durch 20 Basenpaar-DNA ersetzt, die mit einer Konzentration von  $10\ \mu\text{M}$  über das auf der Oberfläche immobilisierte Histon H3 gespült wird (Abbildung 64). Bei der 20 Basenpaar-DNA liegt eine Konzentration von  $400\ \mu\text{M}$  an negativen Ladungen vor. Dies entspricht einem 22-fachen Überschuss an negativer Ladung, der damit noch höher ist, als bei der Kalbsthymus-DNA. Im Gegensatz zur Kalbsthymus-DNA löst die 20 Basenpaar-DNA kein Histon von der Oberfläche ab, sondern bindet noch zu einem gewissen Anteil auf dem gebundenen Histon. Dabei entspricht die abgeschiedene Menge an DNA in etwa  $0.3\ \text{nm}$  ( $3\ \text{\AA}$ ), was in etwa  $1/10$  der Dicke eines DNA-Doppelstranges ( $20\ \text{\AA}$ ) entspricht. Das kann einerseits daran liegen, dass die DNA nicht die komplette Oberfläche vom Histon H3 belegt, sondern nur vereinzelt bindet, da sich die DNA-Stränge durch ihre negative Ladungen gegenseitig abstoßen. Da die Histone rundherum positive Ladungen tragen (die basischen Aminosäuren sind über die Proteinoberfläche verteilt), und die negativen Ladungen auf der DNA-Helix ebenfalls gleichmäßig verteilt sind, können die DNA-Stränge auch nicht direkt an der Oberfläche der Histone binden, sondern sich zwischen die gebundenen Histone schieben. So können zwei oder mehr Histone gleichzeitig an der Seite binden, so dass sich eine einem Nukleosom ähnliche Struktur ausbilden kann.

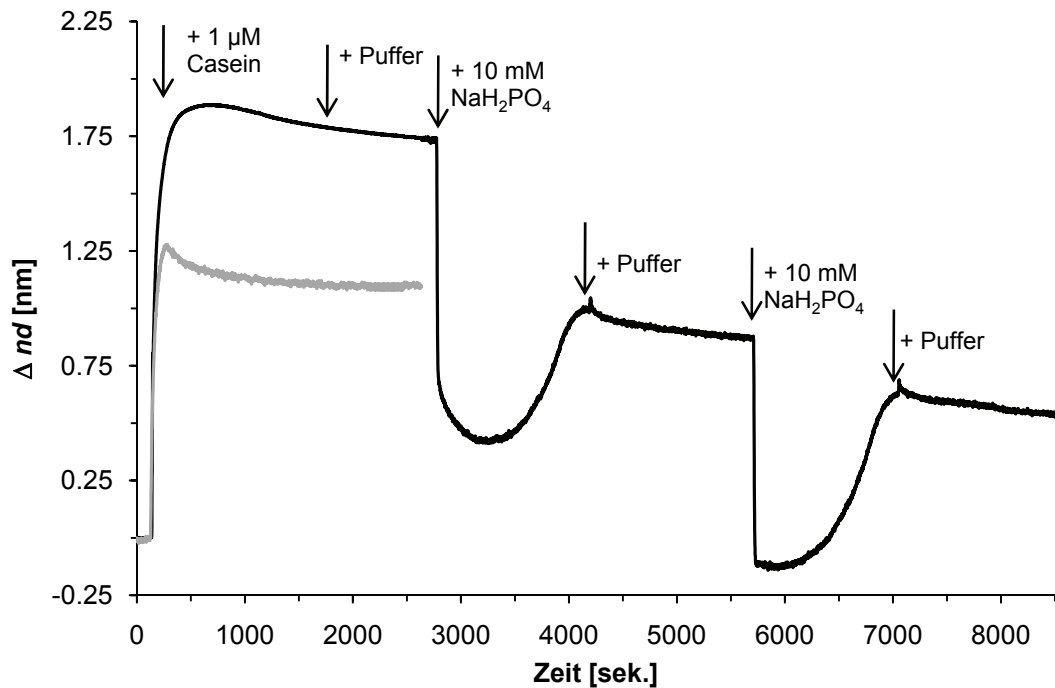


**Abbildung 65:** Auf Rezeptor **11** immobilisiertem Histon H3 ( $1\ \mu\text{M}$ ) bindende 20 Basenpaar-DNA ( $10\ \mu\text{M}$ ).

Die Kalbsthymus-DNA ist mit 20000 Basenpaaren sehr lang und kann sich um die Histone wickeln. Da, aufgrund der Länge, nicht die komplette DNA zur Histonbindung benötigt wird, wird immer ein großer Teil gelöst bleiben, der so die Histone von der Oberfläche mit in das Lösungsmittel reißen kann. Außerdem bewirkt die lange Kalbsthymus-DNA, die einmal um das positiv geladene Histon gewickelt ist, eine Abschirmung der positiven Ladungen. Die ursprünglich positiv geladene Oberfläche des Histons H3 wird durch die DNA-Bindung negativ und so wird die Bindung vom Histon an den Rezeptor **11** geschwächt. Eine Abstoßung zwischen dem, durch die DNA negativ geladenem Histon und den negativ geladenen BP-Rezeptoreinheiten bewirkt die Ablösung des Histons von der Oberfläche.

Bei den irreversibel bindenden Proteinen nimmt Casein (saures Protein mit  $pI = 5.0$ ) eine Ausnahmestellung ein, da es auch auf einer undotierten Oberfläche aus 100 % SOPC einen erheblichen irreversiblen Bindungsanteil aufweist. Mit eingelagertem Rezeptor erhöht sich die Bindung des Caseins auf der Oberfläche um fast das Doppelte.

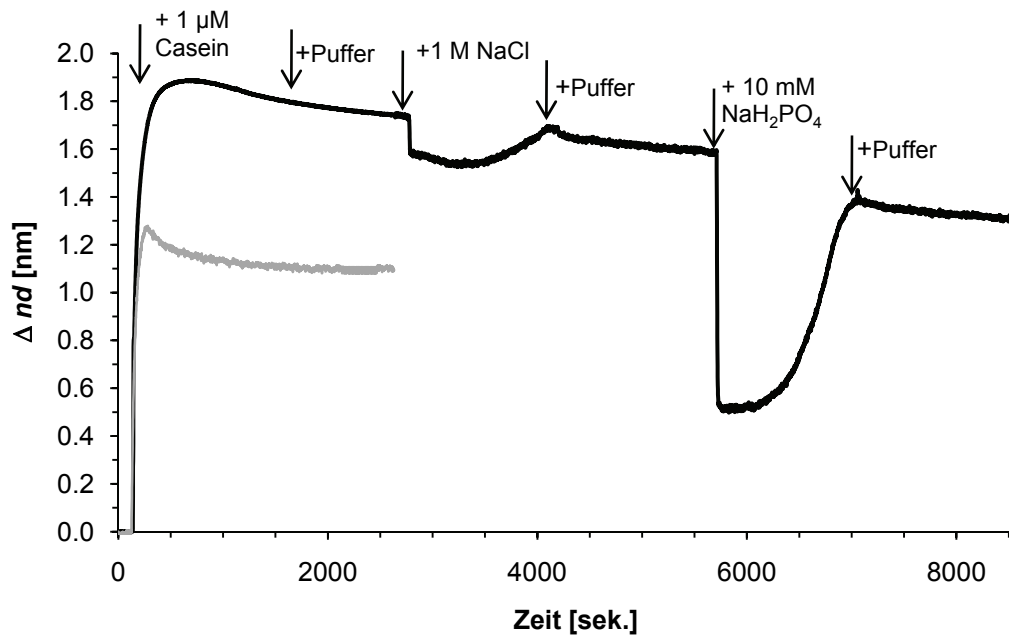
Dazu trägt bei, dass Casein ein ausgezeichneter Phosphatbinder ist<sup>[187, 188, 229]</sup> und sowohl die Phosphatidylcholin-Oberfläche mit Phosphaten bestückt ist, als auch der Rezeptor **11** mit den Bisphosphonat-Erkennungseinheiten. Dass die Bindung hauptsächlich auf eine Phosphatbindung zurückzuführen ist, zeigt eindeutig die in Abbildung 66 gezeigte Messung. Mit zwei Spülvorgängen von 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  konnte fast das gesamte irreversibel auf der Oberfläche gebundene Casein entfernt werden, indem das Casein an die in hoher Konzentration in Lösung befindlichen Phosphat-Ionen bindet und so regelrecht von der Oberfläche gespült werden kann.



**Abbildung 66:** Schwarz: Verdrängungsexperiment von 1  $\mu\text{M}$  Casein immobilisiert auf **11**/SOPC (10:90) Lipiddoppelschicht mit  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ . Grau: Blindprobe: 1  $\mu\text{M}$  Casein auf SOPC.

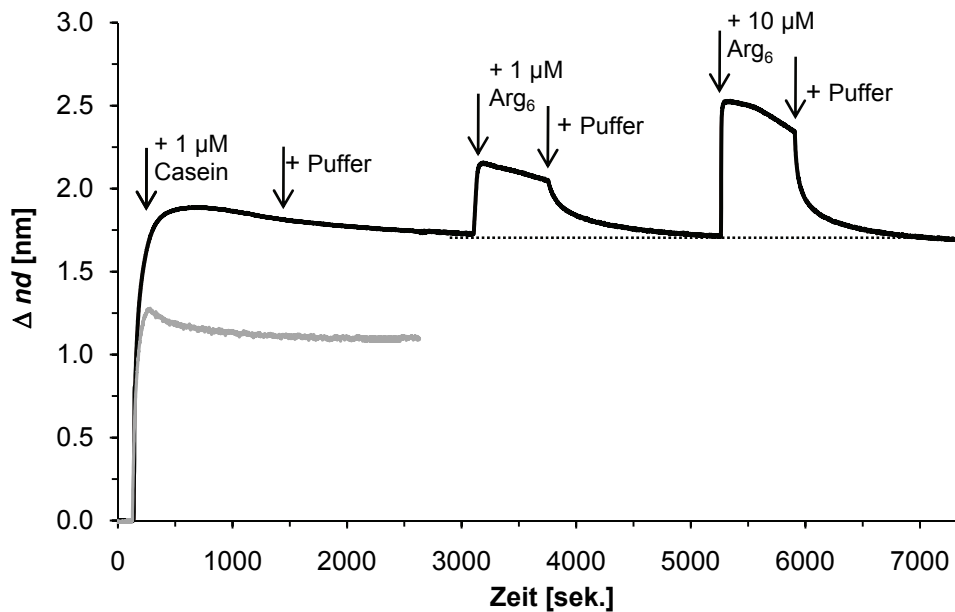
Dass die Ablösung des Caseins von der Oberfläche nicht an der hohen Ionendichte, bedingt durch das  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  in der Lösung, liegt, sondern tatsächlich auf die Phosphatbindung zurückzuführen ist, ist in Abbildung 67 gezeigt. Das Spülen von 1 M NaCl über die Oberfläche bewirkt keine Ablösung von Casein, jedoch lässt eine anschließende Zugabe von  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  die Dicke des gebundenen Caseins abnehmen. Auf diese Weise konnte eindeutig gezeigt werden, dass die unerwartete irreversible Bindung des sauren Proteins Caseins auf der Oberfläche nichts mit der Bindung an den Rezeptor **11** zurückzuführen ist, sondern dass diese starke Bindung auf einer unspezifischen Phosphat-Bindung beruht. Da der Rezeptor zufällig Rezeptoreinheiten auf Phosphatbasis trägt, bewirkt die Anwesenheit des Rezeptors auf der Oberfläche eine weitere Verstärkung der Bindung des Caseins.





**Abbildung 67:** Grau: Casein 1  $\mu$ M Blindprobe auf SOPC. Schwarz: Casein 1  $\mu$ M auf Lipiddoppelschicht **11**/SOPC 10:90, Verdrängungsversuche mit 1 M NaCl und 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ .

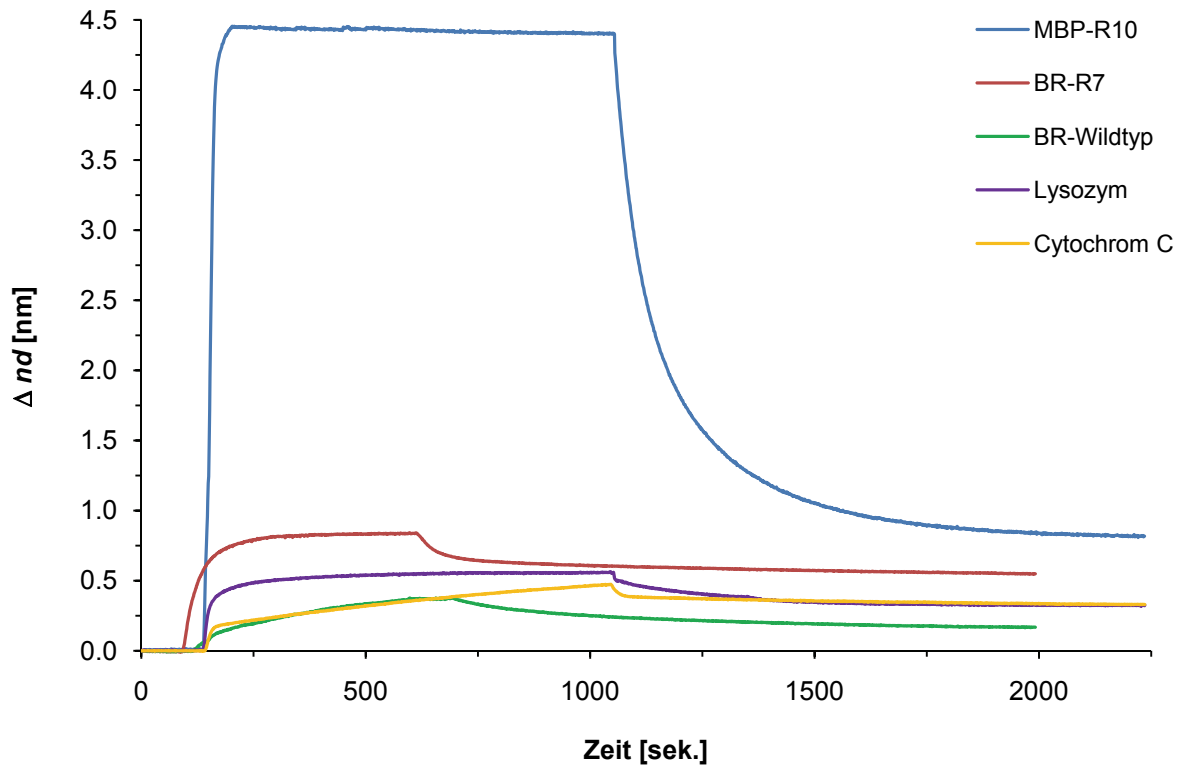
Des Weiteren sollte überprüft werden, ob das Casein auch mit einem besseren Gast für das Bisphosphonat-Rezeptorlipid, in diesem Fall das von Rezeptorlipid **11** sehr stark gebundene Hexaarginin-Peptid, verdrängt werden kann. Wie in der Messung in Abbildung 68 gezeigt, ist selbst durch hohe Konzentrationen von Hexaarginin (1  $\mu$ M und 10  $\mu$ M) keine Ablösung des auf der Oberfläche gebundenen Caseins möglich. Die Phosphatbindung ist also irreversibel und dadurch extrem stark und kann selbst durch das Angebot des idealen Bindungspartners für **11** nicht gelöst werden. Nur die Konkurrenz von anderen Phosphat-Ionen in der Lösung kann das Casein von der Oberfläche ablösen.



**Abbildung 68:** Schwarz: 1  $\mu$ M Casein auf Lipiddoppelschicht aus 10 % **11** und 90 % SOPC, grau: 1  $\mu$ M Casein auf Lipiddoppelschicht aus 100 % SOPC (Blindprobe).

Die zweite Gruppe der untersuchten Proteine bildet die zu einem großen Anteil irreversibel auf der dotierten Oberfläche bindenden Proteine, wie Lysozym, Cytochrom C, MBP-R10 und BR-R7 (Abbildung 69). In dieser Gruppe sind ebenfalls, wie erwartet, die beiden nächstbasischen Proteine mit pI-Werten um 9, Lysozym und Cytochrom C. Damit zeigen die basischsten Proteine, die in dieser Arbeit untersucht wurden (Histon H3, Histon H1, Cytochrom C, Lysozym und Papain), durchweg irreversible oder zumindest teilweise irreversible Bindung zum, in der Lipiddoppelschicht immobilisierten, Rezeptor **11**. Lysozym als argininreiches Protein zeigt auch im RIfS auf der Oberfläche eine stärkere reversible Bindung, als das Cytochrom C. Der irreversible Bindungsanteil ist für beide Proteine ungefähr gleich groß. Die abgeschätzte Assoziationskonstante  $K_a$  ist für das Lysozym um eine Größenordnung größer, als die des Cytochrom C. Die Dissoziationskonstante  $K_D$  liegt eine Größenordnung unter der des Cytochrom C (Tabelle 6), was auch auf der Oberfläche die Ergebnisse der Filmwaagemessung und der Fluoreszenztitrationen bestätigt. Dass die abgeschätzten Bindungskonstanten für Lysozym und Cytochrom C in ihrer Größenordnung und Differenz richtig zu sein scheinen, wird durch die Betrachtung der Assoziations- bzw. Dissoziationskinetik durch Fitten der RIfS-Kurven aus Abbildung 69 mit der *BIAevaluation* Software<sup>[224]</sup>, wie schon oben

beschrieben, bestätigt. Auch in der Kinetik unterscheiden sich die beiden Enzyme um eine Größenordnung.



**Abbildung 69:** Teilweise irreversibel bindende Proteine mit höchster gemessener Konzentration ( $1 \mu\text{M}$ ) auf **11/SOPC 10:90** Lipiddoppelschicht.

**Tabelle 6:** Ergebnisse der RfS-Titrationsen der teilweise irreversibel bindenden Proteine auf Lipiddoppelschichten **11/SOPC 10:90**.

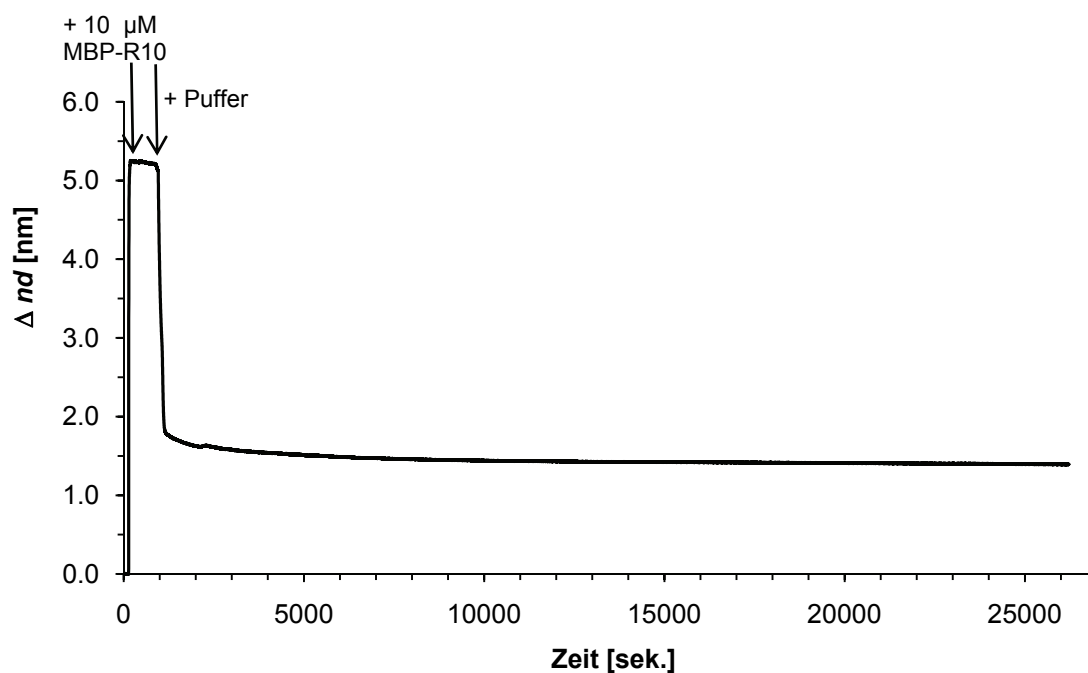
	pl	MW [kDa]	reversibel		irreversibel	
			$K_a$ [ $\text{M}^{-1}$ ]	$K_D$ [M]	$k_a$ [ $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	$k_d$ [ $\text{s}^{-1}$ ]
<b>Lysozym</b>	9.1	14.5	$1.1 \cdot 10^7$	$8.9 \cdot 10^{-8}$	$4.7 \cdot 10^4$	$5.6 \cdot 10^{-5}$
<b>Cytochrom C</b>	9.2	12.3	$6.4 \cdot 10^6$	$1.6 \cdot 10^{-7}$	$1.2 \cdot 10^3$	$8.4 \cdot 10^{-4}$
<b>MBP-R10</b>	6.4	42.5	$1.4 \cdot 10^7$	$7.3 \cdot 10^{-8}$	$9.5 \cdot 10^4$	$6.9 \cdot 10^{-3}$
<b>BR-R7</b>	6.1	26.8	$1.7 \cdot 10^6$	$6.0 \cdot 10^{-7}$	$2.1 \cdot 10^2$	$1.3 \cdot 10^{-4}$
<b>BR Wildtyp</b>	6.2	26.8	$6.8 \cdot 10^4$	$1.5 \cdot 10^{-5}$	$3.9 \cdot 10^1$	$5.8 \cdot 10^{-4}$

Die beiden, mit einem pI-Wert von 5, eigentlich sauren Proteine MBP und BR, sollten eigentlich keine Affinität zum Rezeptor **11** aufweisen. Aus den Bindungsstudien mit den Oligoarginin-Peptiden geht die starke Bindung dieser linearen Peptide zum Rezeptor **11** hervor. Im Molecular Modelling wurde die starke Bindung eines Hexaarginin-Peptids und Decaarginin-Peptids *in silico* gezeigt. Aus diesem Grund sollte es auch möglich sein, die eigentlich sauren Proteine über die rekombinante Einführung eines sogenannten Tags, in diesem Fall eines Arginin-Tags, mit dem Rezeptorlipid **11** auf der Oberfläche binden und immobilisieren zu können. Für das Maltosebindeprotein (MBP) wurde ein Tag aus 10 Argininen eingeführt, beim Transmembranprotein Bakteriorhodopsin (BR) ein Tag aus 7 Argininen. Die rekombinanten Proteine wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jacob Piehler, das MBP-R10 und das MBP-H10, (Universität Osnabrück) und der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Norbert Hampp, natives Bakteriorhodopsin (Wildtyp) und das BR-R7, (Philipps-Universität Marburg) zur Verfügung gestellt.

Das Bakteriorhodopsin bindet auch ohne 7er Arginin-Tag (R7), als sogenannter Wildtyp, schon leicht irreversibel auf der funktionalisierten Lipiddoppelschicht. Das liegt wahrscheinlich daran, dass es als membranständiges Protein auch innerhalb dieser Membran untersucht wurde. Die kleinen Zellmembranstücke wurden zwar mittels Ultraschall zerkleinert, aber trotzdem können so auch unspezifische Intermembranwechselwirkungen zwischen der Lipiddoppelschicht und den Membranen, in denen das BR lokalisiert ist, stattfinden. Trotz dieser unspezifischen Membranwechselwirkungen ist der Einfluss durch den Arginin-Tag klar zu erkennen. Das BR-R7 Protein bindet um 2/3 besser, als der ungetaggte Wildtyp des BR. Die Assoziationskonstante  $K_a$  steigt für das BR-R7 gegenüber dem BR-Wildtyp um zwei Größenordnungen von  $10^4 \text{ M}^{-1}$  auf  $10^6 \text{ M}^{-1}$ . Die Dissoziationskonstante  $K_D$  fällt ebenfalls, vom BR-Wildtyp zum BR-R7, um zwei Größenordnungen, von  $10^{-5} \text{ M}$  auf  $10^{-7} \text{ M}$ , was eine Steigerung der Bindungsstärke anzeigt. Auch wenn davon ausgegangen werden muss, dass ein gewisser Teil der Bindung, auch der irreversiblen Bindung, durch Intermembranwechselwirkungen zustande kommt, ist doch ein erheblicher Anteil der Bindung auf die Einführung des 7er Arginin-Tags zurückzuführen. Verglichen mit dem Hexaarginin-Peptid auf der Oberfläche, ist die Bindung für das BR-R7 jedoch immer noch um zwei Größenordnungen kleiner. Wahrscheinlich wirkt die große Anzahl an negativen Ladungen auf der Oberfläche des BR-R7, trotz der Einführung der basischen Domäne, immer noch einer Bindung,

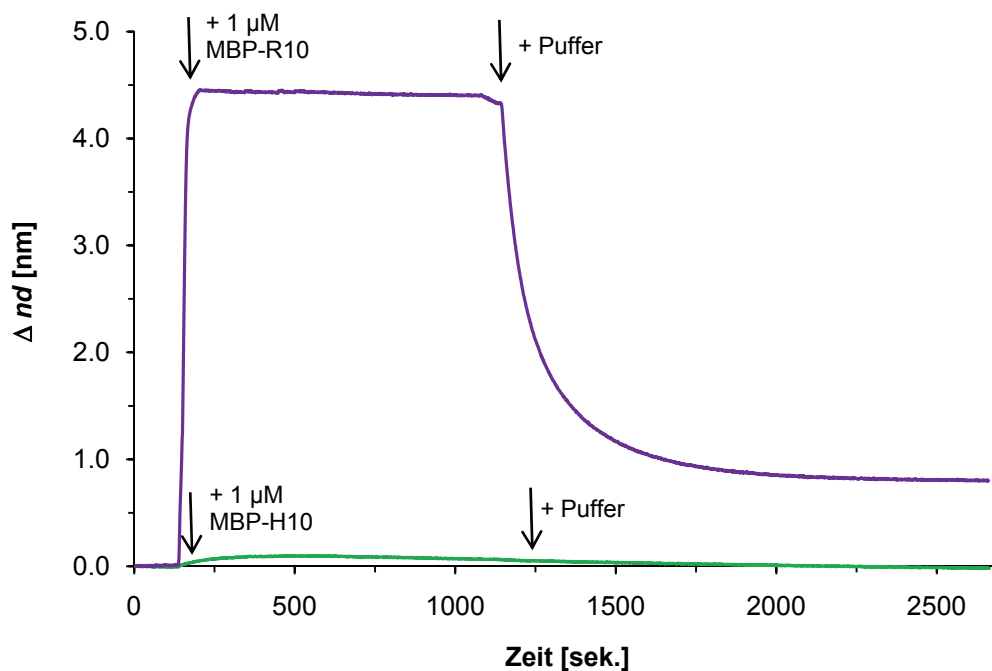
in einer dem Hexaarginin-Peptid vergleichbaren Stärke, entgegen. Auch die Größe und die Sperrigkeit des membranständigen BR-R7 könnte einer stärkeren Bindung entgegenwirken.

Für das MBP-R10 wird der größte in dieser Arbeit gemessene Anstieg der optischen Schichtdicke von 4.5 nm beobachtet. Das bedeutet, dass auch die stärkste reversible Bindung erreicht wird. Der irreversible Bindungsanteil ist ebenfalls der stärkste, der in dieser Arbeit gemessen wurde. Ungefähr 1 nm optische Schichtdicke bleibt als MBP-R10 bei Injektion von 1  $\mu\text{M}$  MBP-R10 auf einer zu 10 % mit **11** dotierten Lipiddoppelschicht erhalten. Bei Injektion der 10-fachen Konzentration (10  $\mu\text{M}$  MBP-R10) bleiben sogar 1.5 nm optische Schichtdicke an MBP-R10 auf der Lipidoberfläche irreversibel gebunden. Bei einer Langzeitmessung nach Immobilisierung von 10  $\mu\text{M}$  MBP-R10 über mehr als sieben Stunden wurde die Irreversibilität der Bindung bestätigt (Abbildung 70). Auch nach dieser langen Zeit des Spülens von Puffer über die Oberfläche, konnte keine weitere Ablösung des MBP-R10 von der Lipidoberfläche beobachtet werden. Der gebundene Anteil bleibt auch über den langen Zeitraum unverändert gebunden. Die Bindungskonstanten für die 1  $\mu\text{M}$  Immobilisierung von MBP-R10 liegen in der Größenordnung von Lysozym und Cytochrom C, mit einer abgeschätzten  $K_a$  von  $1.4 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$  und einer  $K_D$  von  $7.3 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ .



**Abbildung 70:** Immobilisierung von 10  $\mu\text{M}$  MBP-R10 auf eine Lipiddoppelschicht **11**/SOPC 10:90 und Spülen mit Puffer für 437 min. (7 h 17 min.).

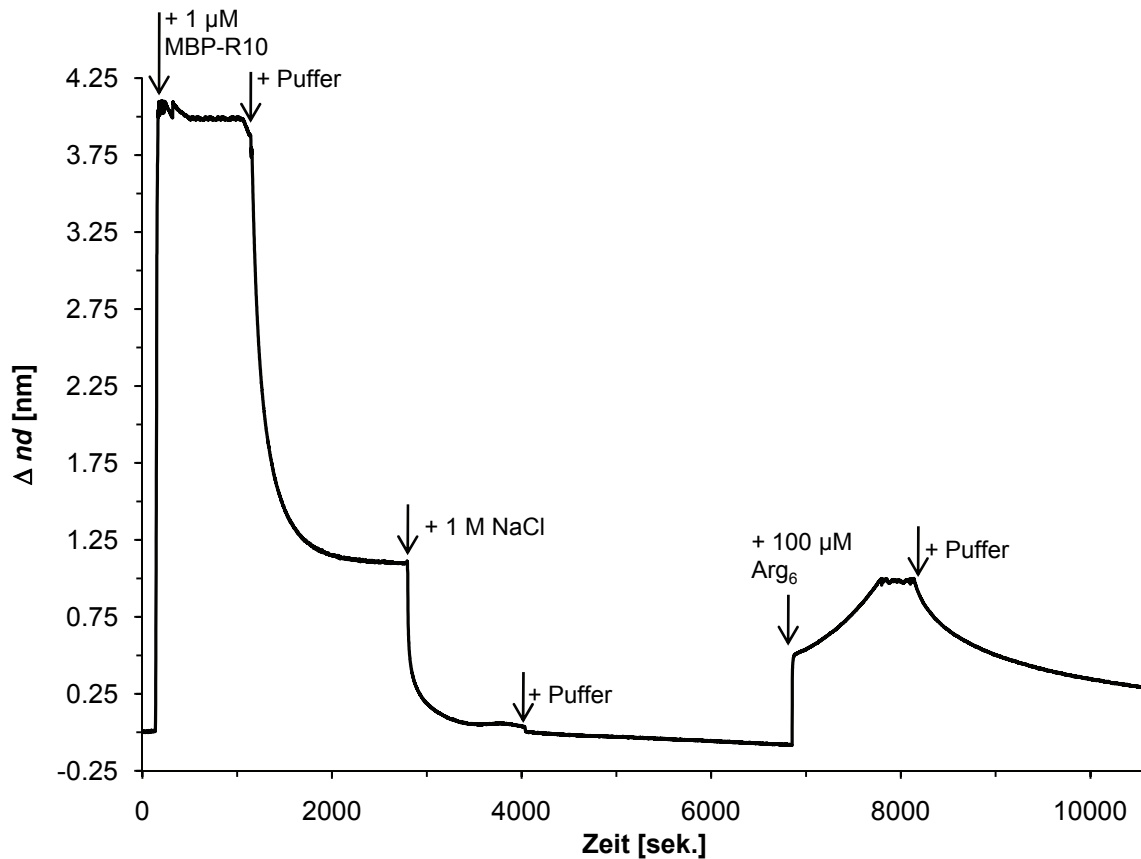
Auch beim MBP-R10 ist die Bindung an das Rezeptorlipid **11** eindeutig auf die Einführung des 10er Arginin-Tags zurückzuführen. In Abbildung 71 wird der Vergleich der Bindungseigenschaften des MBP-R10 mit dem MBP-H10, welches einen 10er Histidin-Tag enthält, gezeigt. MBP-H10 zeigt mit 1  $\mu$ M Konzentration keine Bindung zum Rezeptorlipid, während MBP-R10 zu 1/3 irreversibel an den Rezeptor **11** bindet.



**Abbildung 71:** Vergleich der Oberflächenbindung von 1  $\mu$ M MBP-R10 und 1  $\mu$ M MBP-H10 auf einer **11**/SOPC 10:90 Lipiddoppelschicht.

In Abbildung 72 ist ein Verdrängungsexperiment gezeigt. 1  $\mu$ M MBP-R10 auf der funktionalisierten Lipiddoppelschicht kann schon mit einem einzigen Spülgang mit 1 M NaCl vollständig von der Oberfläche entfernt werden. Dieses zeigt, dass schon eine einmalige Erhöhung der Salzkonzentration um das siebenfache der ohnehin im Puffer enthaltenen Salzkonzentration (150 mM NaCl) ausreicht, um die Bindung vollständig reversibel zu machen. Umso beeindruckender ist unter diesen Erkenntnissen, die auch über einen langen Zeitraum stabile und irreversible Bindung von MBP-R10 bei 20 mM HEPES-Pufferkonzentration und 150 mM NaCl. Im Gegensatz zum Histon H3, bei dem durch dreimaliges Spülen mit 1 M NaCl nur etwa 1/3 der ursprünglich gebundenen Proteinmenge entfernt werden konnte, reicht beim

MBP-R10 schon ein einziger Spülgang, um das Protein vollständig entfernen zu können.

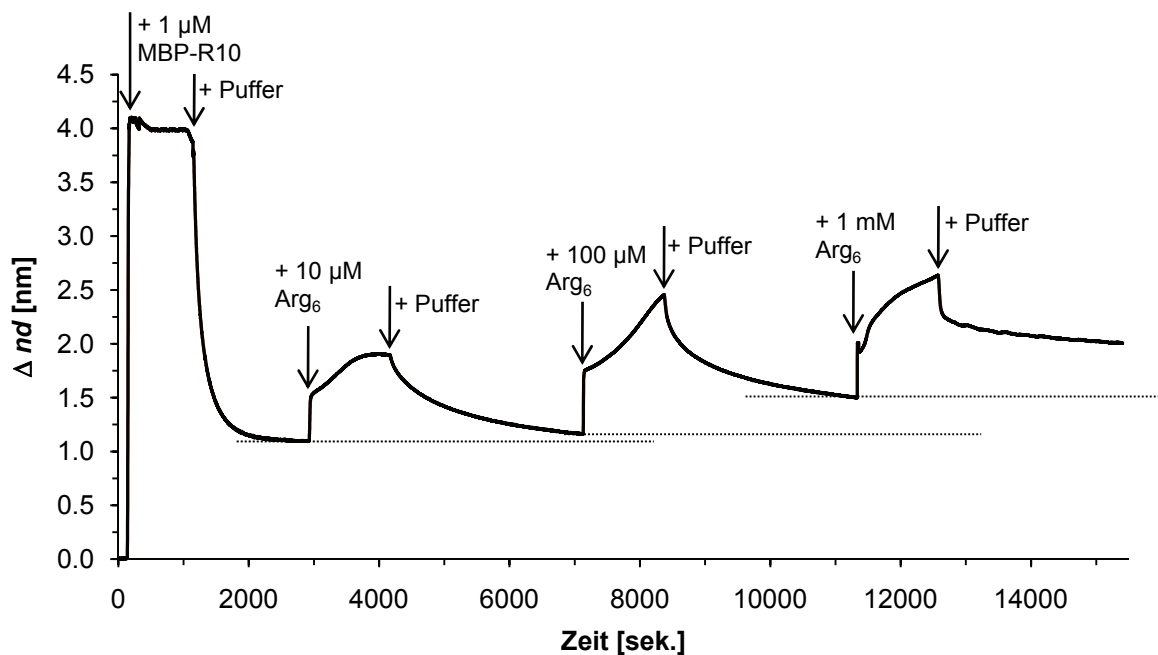


**Abbildung 72:** Verdrängungsexperiment mit 1  $\mu\text{M}$  MBP-R10, immobilisiert auf Lipiddoppelschicht 11/SOPC 10:90, mit 1 M NaCl. Anschließend Bindungsüberprüfung mit 100  $\mu\text{M}$  Hexaarginin.

Die Bindung des Histons scheint also durch mehrere Wechselwirkungen zustande zu kommen, die eine höhere Ionenstärke benötigen, um vollständig aufgehoben zu werden, als es beim MBP-R10 der Fall ist. Denkbar sind bei Histon H3 durch die Größe der Bindungsfläche (Proteinoberfläche), die Bindung des Proteins über mehrere Rezeptoren an der Oberfläche (Multipunktwechselwirkungen). Da die Proteinoberfläche von Histon H3 gleichmäßig und sehr dicht von basischen Aminosäuren besetzt ist (Kristallstruktur in Abbildung 37), ist es sehr wahrscheinlich, dass es nicht nur über einen einzigen Rezeptor, sondern über mehrere Rezeptoren auf der Oberfläche gebunden wird. Das MBP wird nur über den 10er Arginin-Tag auf der Oberfläche gebunden. Da noch ein kleiner Abstand zwischen Protein und Rezeptor vorhanden sein wird, kann vermutlich nicht das komplette Decapeptid des Tags zur

Bindung eingesetzt werden. Es steht nur ein Bindungsmotiv von vielleicht sechs oder sieben Argininen zur Verfügung, so dass das Modell des Hexaarginins als Bindungsmotiv angenommen werden kann. Da hier in den Fluoreszenzmessungen ein 1:1-Komplex gefunden wurde, kann das MBP über den 10er Arginin-Tag wahrscheinlich auch nur über einen 1:1-Komplex gebunden werden, was die Bindungsstärke gegenüber einem Multipunktkomplex beim Histon H3 deutlich herabsetzen sollte und so die leichtere Entfernung von der Oberfläche durch Erhöhung der Ionenstärke im Puffer erklären könnte.

Der Versuch, das MBP-R10 durch Konkurrenzexperimente von der Oberfläche zu verdrängen ist in Abbildung 73 gezeigt. Es wurde versucht 1  $\mu\text{M}$  immobilisiertes MBP-R10 mit dem sehr gut bindenden Hexaarginin-Peptid in hohen Konzentrationen von 10  $\mu\text{M}$  bis 1 mM von der Oberfläche zu spülen, wie es mit 1 M NaCl-Lösung erfolgreich möglich war. Anstelle einer Ablösung des Proteins von der Oberfläche, wird jedoch eine Zunahme der optischen Schichtdicke beobachtet, besonders deutlich wird diese Zunahme bei der größten Konzentration an Hexaarginin-Peptid von 1 mM.

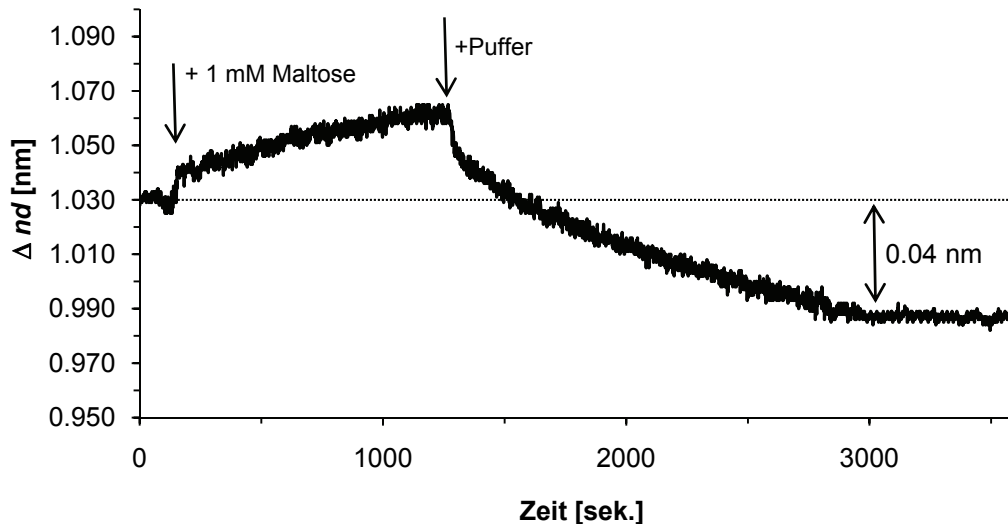


**Abbildung 73:** Konkurrenzexperiment mit 1  $\mu\text{M}$  MBP-R10, immobilisiert auf Lipiddoppelschicht 11/SOPC 10:90, mit Hexaarginin-Peptiden in ansteigender Konzentration (10  $\mu\text{M}$  bis 1 mM).



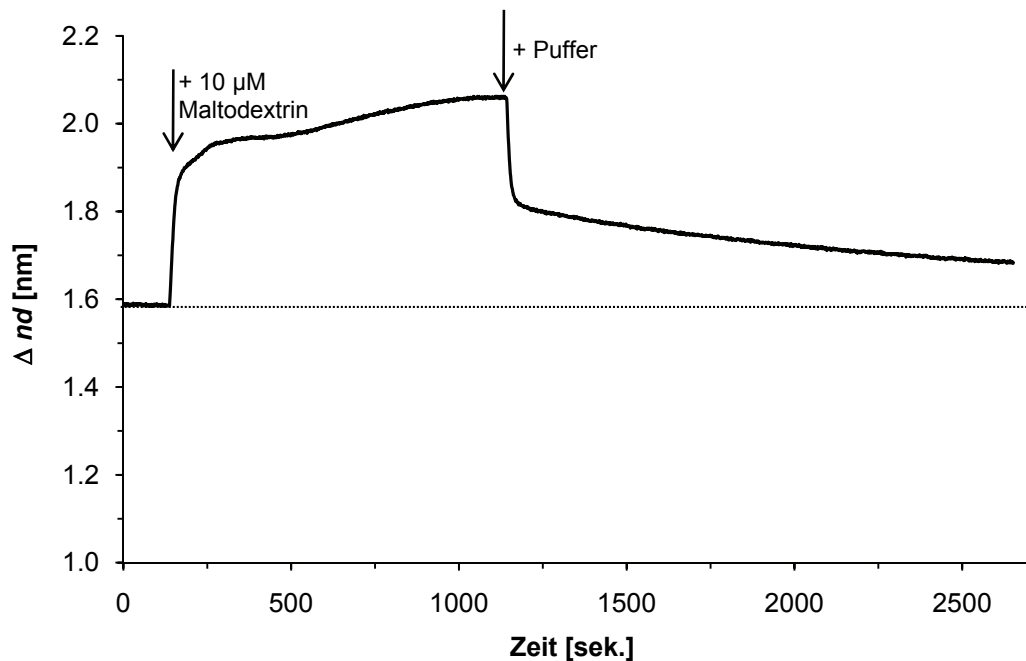
Die weitere Zunahme der optischen Schichtdicke durch Zugabe von Hexaarginin-Peptid zeigt, dass die Bindungsstärke des Hexaarginin-Peptids nicht stärker ist, als die des MBP-R10, da ansonsten eine Verdrängung des Proteins durch das Peptid stattfände, was in einer Abnahme der optischen Schichtdicke resultieren würde. Stattdessen wird noch weiteres Peptid, neben dem schon immobilisierten Protein, gebunden. Dies kann so erklärt werden, dass einerseits ein Teil des MBP-R10 reversibel gebunden wird und durch das Spülen mit Puffer einige Rezeptorplätze wieder frei geworden sind, um nun das Oligopeptid binden zu können. Andererseits ist es ebenso möglich, dass der Arginin-Tag nur ein bis maximal zwei Rezeptoren zur Bindung des MBP benötigt. Wie schon oben erwähnt ist ein 1:1-Komplex sehr wahrscheinlich. Da so nur ein Rezeptor zur Bindung benötigt wird, das MBP aber ein sehr großes Protein ist, kann es die Oberfläche wie ein Regenschirm gut abschirmen, so dass darunter viele freie Rezeptoren liegen, die bei Zugabe des Arginin-Peptids frei sind und dieses binden können. Wie schon zu Beginn dieses Abschnitts abgeschätzt und in Abbildung 56 gezeigt, ist vermutlich die ganze Oberfläche mit Rezeptoren funktionalisiert.

Um zu überprüfen, ob sich das über den 10er Arginin-Tag immobilisierte MBP noch in einem funktionalen Zustand befindet, wurde 1 mM Maltose über das auf der Lipiddoppelschicht immobilisierte Protein gespült. Das Problem bei diesem Versuch ist das geringe Molekulargewicht der Maltose von 360 g/mol. Wie schon mit den kleinen Arginin-Peptiden Diarginin und Triarginin gezeigt, ist die Bindung von solch kleinen Molekülen auf der Oberfläche schwer zu detektieren. Jedoch konnte ein Effekt bei Zugabe von 1 mM Maltose beobachtet werden. Allerdings zeigte sich der Effekt nicht wie erwartet, in einer Zunahme der optischen Schichtdicke, sondern in einer Abnahme (Abbildung 74) von 0.04 nm. Die Abnahme der Schichtdicke ist kein Drift in der Grundlinie, da sie nach etwa 3000 sek. wieder eine stabile Form annimmt. In der Literatur wurde dieser Effekt auch schon beobachtet und beschrieben. Die Abnahme der optischen Schichtdicke kommt dadurch zustande, dass durch Bindung der Maltose an das Maltosebindeprotein, dieses eine Konformationsänderung erfährt, wodurch die optische Schichtdicke zwar nur leicht, aber doch erkennbar, abnimmt<sup>[230]</sup>. Das MBP-R10 befindet sich also noch in bioaktiver Form und konnte durch den Arg-Tag funktional auf der Oberfläche immobilisiert werden.



**Abbildung 74:** Bindung von 1 mM Maltose auf 1  $\mu$ M immobilisiertem MBP-R10, wodurch eine Konformationsänderung entsteht, die in einer kleinen Abnahme der optischen Schichtdicke resultiert.

Um die Bindung der Maltose an das immobilisierte Maltosebindeprotein (MBP) effektiver sichtbar zu machen und damit nochmal eine weitere Bestätigung zur Aktivität des Enzyms zu bekommen, wurde zu dem immobilisierten MBP eine Lösung von 10  $\mu$ M Maltodextrin (polymere und oligomere Maltose) gegeben. Dabei konnte ein deutlicher Anstieg der optischen Schichtdicke gemessen werden, welcher durch die Bindung der Maltoseeinheiten im Maltodextrin herrührt. Die Konformationsänderung des Proteins ist nicht mehr messbar, da die Größe des gebundenen Moleküls die Schichtdickenänderung durch die Konformationsänderung durch Bindung der Maltose bei weitem übersteigt. Das mittlere Molekulargewicht des Maltodextrins liegt bei etwa 2000 g/mol und ist damit in etwa fünf bis sechsmal größer, als das der Maltose. Wird nun eine Maltoseeinheit vom MBP gebunden, bleibt auch der Rest des Oligomers (Polymers) auf der Oberfläche gebunden, was in dem deutlich sichtbaren Anstieg der optischen Schichtdicke messbar wird (Abbildung 75). Auch mit diesem Versuch konnte die Bindung von Maltose an das immobilisierte MBP-R10 bestätigt werden. Das auf der Lipiddoppelschicht mit dem Rezeptor **11** über einen Arginin-Tag gebundene MBP-R10 ist in bioaktiver Form erfolgreich immobilisiert worden.



**Abbildung 75:** Bindung von 10  $\mu$ M Maltodextrin auf 1  $\mu$ M immobilisiertem MBP-R10.

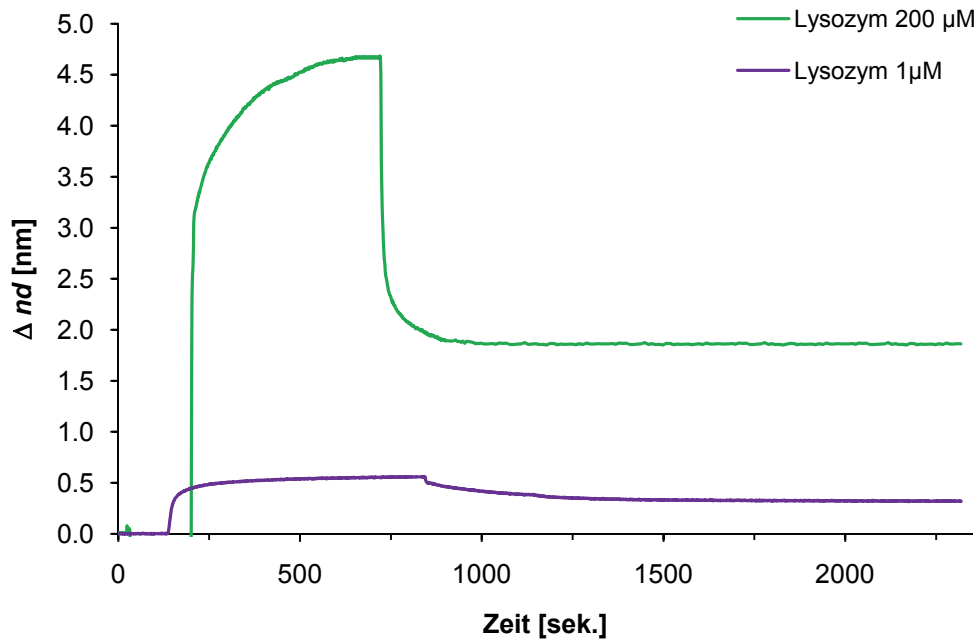
Als nächstes wurde versucht, die Funktionsfähigkeit von an der Proteinoberfläche immobilisiertem Lysozym festzustellen. In der Literatur wurden in den letzten drei Jahren Wechselwirkungen zwischen Lysozym und apo- $\alpha$ -Lactalbumin (Calcium freies Lactalbumin)<sup>[231-233]</sup> von *S. Bouhallab* und Wechselwirkungen zwischen Lysozym und dem kleinen Molekül Chloramphenicol<sup>[234]</sup> von *L. Zhang* beschrieben. Dabei wurden die Wechselwirkungen allerdings nicht auf der Oberfläche, sondern in Lösung mittels Fluoreszenzspektroskopie, UV/vis-Spektroskopie, Circular-Dichroismus-Spektroskopie und Isothermaler Titrationskalorimetrie untersucht. Lactalbumin ist ein negativ geladenes Protein, welches durch elektrostatische Wechselwirkungen an das basische und damit positiv geladene Lysozym bindet.

Diese Bindung konnte auf der Oberfläche nicht beobachtet werden, es konnte keine Wechselwirkung mit dem injizierten Lactalbumin gemessen werden. Dieses kann einerseits daran liegen, dass die Salzkonzentration im Puffer zu groß war und die Bindung durch die hohe Ionenstärke nicht stattfinden konnte (in der Literatur wurde nur bis zu einer Konzentration von 124 mM NaCl gemessen, wobei schon dort eine extreme Verschlechterung der Bindung festgestellt wurde)<sup>[231]</sup>, oder aber das Lysozym weist an der Seite, die in die Lösung zeigt, zu wenige positive Ladungen auf, da diese alle zu den Rezeptoren gerichtet sind und so verdeckt bzw. gebunden

werden. Außerdem könnte die Bindung auf der Oberfläche eine Wechselwirkung, die in der Literatur als Aggregatbildung beschrieben wird, durch die eingeschränkten Freiheitsgrade auf der Oberfläche verhindert werden.

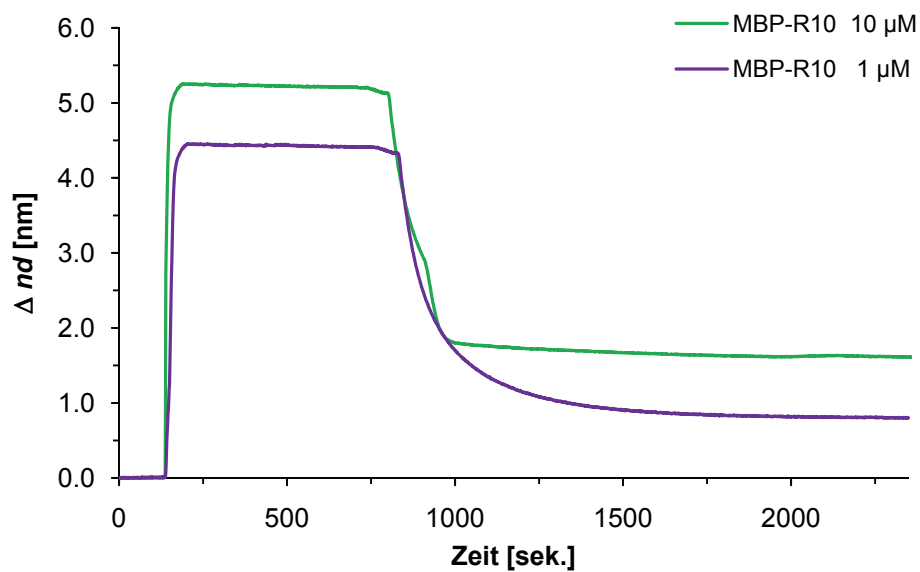
Eine Wechselwirkung mit dem kleinen Breitbandantibiotikum Chloramphenicol (molare Masse: 323 g/mol), die durch hydrophobe Wechselwirkungen, aber auch durch Wasserstoffbrückenbindungen stattfinden, konnte auf der Oberfläche mit immobilisiertem Lysozym ebenfalls nicht beobachtet werden. Es könnte sein, dass einerseits die gleichen Probleme, wie mit der Maltose hier eine Rolle spielen (zu kleines Molekül). Andererseits kann auch die Bindungsstelle für das Chloramphenicol am Lysozym durch die Oberflächenbindung verdeckt werden. Eine Wechselwirkung mit Lysozym konnte für beide in der Literatur beschriebenen Wechselwirkungen nicht gefunden werden.

Während der Konkurrenzexperimente auf immobilisiertem MBP-R10 mit Hexaarginin-Peptiden in hohen Konzentrationen wurde gefunden, dass auch die Konzentration des Peptids zur Menge des auf der Oberfläche gebundenen Peptids und damit zum Anstieg der optischen Schichtdicke beiträgt (Abbildung 73). So wurden bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  Hexaarginin eine Erhöhung der optischen Schichtdicke von 0.1 nm erreicht. Eine Verzehnfachung der Konzentration auf 100  $\mu\text{M}$  Hexaarginin resultierte bereits in einer Vergrößerung der optischen Schichtdicke von 0.5 nm. Bei einer Konzentration von 1 mM Hexaarginin-Peptid wurde dann eine Zunahme der optischen Schichtdicke von 0.8 nm beobachtet. Um dieses Phänomen für Proteine weiter zu untersuchen, wurde zum Einen eine große Konzentration Lysozym (200  $\mu\text{M}$ ) auf die Lipiddoppelschicht aus **11**/SOPC 10:90 gegeben (Abbildung 76).



**Abbildung 76:** Bindung von 1  $\mu\text{M}$  Lysozym und 200  $\mu\text{M}$  Lysozym auf einer Lipiddoppelschicht 11/SOPC 10:90.

Zum Anderen wurde der Einfluss der Erhöhung der Konzentration auf die Bindung des rekombinanten MBP-R10 untersucht (Abbildung 77). Dazu wurden 10  $\mu\text{M}$  und 1  $\mu\text{M}$  MBP-R10 auf der Lipiddoppelschicht aus 11/SOPC 10:90 immobilisiert.



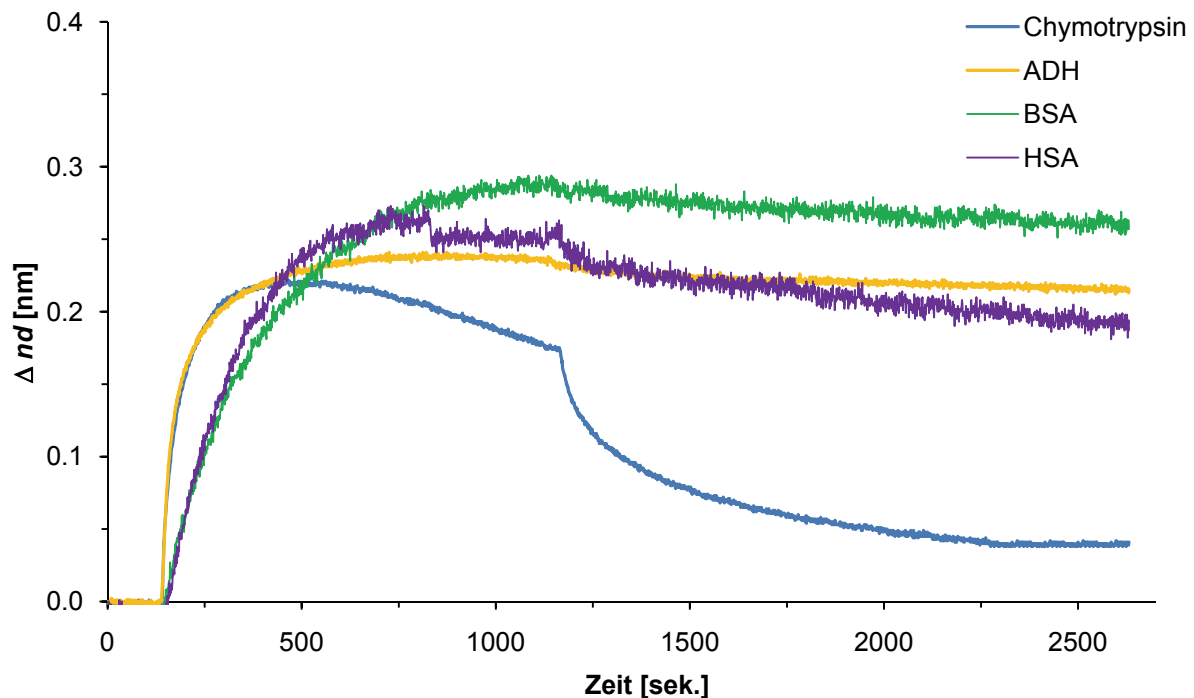
**Abbildung 77:** Bindung von 1  $\mu\text{M}$  MBP-R10 und 10  $\mu\text{M}$  Lysozym auf einer Lipiddoppelschicht 11/SOPC 10:90.

Hier zeigt sich ebenfalls, dass eine Erhöhung der Konzentration an Proteinen zur Erhöhung des irreversibel immobilisierten Anteils des jeweiligen Proteins führt. Beim Lysozym wird bei der Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  ein reversibler Bindungsanteil von 0.6 nm und ein irreversibler Anteil von 0.4 nm erreicht. Es verbleiben also 2/3 des Proteins irreversibel auf der Oberfläche gebunden. Wird die Konzentration auf das 200-fache, auf 200  $\mu\text{M}$ , erhöht, erhält man einen reversiblen Bindungsanteil von 4.6 nm optischer Schichtdicke, der auf einen irreversibel gebundenen Anteil um mehr als die Hälfte (2.0 nm) abfällt. Der Abfall der optischen Schichtdicke ist also bei hohen Konzentrationen größer, trotzdem bleibt aber viel mehr Protein auf der Oberfläche gebunden.

Beim MBP-R10 verursacht eine Verzehnfachung der Konzentration eine Erhöhung der optischen Schichtdicke beim reversiblen Bindungsanteil um fast 1 nm auf 5.4 nm. Der irreversible Bindungsanteil steigt hingegen nur um 0.8 nm optische Schichtdicke. Aber auch hier führt eine höhere Proteinkonzentration zur Immobilisierung von deutlich mehr Protein. Wenn es auf die Menge an immobilisiertem Protein ankommt, sollte die Konzentration des zu bindenden Proteins so hoch wie möglich gewählt werden, um eine möglichst große Menge auf der Oberfläche binden zu können.

Die dritte Klasse der untersuchten Proteine bilden die kaum bindenden Proteine, bei denen nur ein sehr kleiner Anteil auf der Oberfläche gebunden wird. Zu diesen Proteinen zählen HSA, BSA, ADH und Chymotrypsin (Abbildung 78, Tabelle 7). Bei diesen Proteinen handelt es sich, bis auf das Chymotrypsin, durchweg um saure Proteine (Tabelle 1, Abbildung 36). Chymotrypsin ist mit einem pI-Wert von 8.5 sehr basisch, besitzt aber trotzdem ein recht ausgeglichenes Verhältnis zwischen sauren und basischen Aminosäuren auf der Oberfläche. Es ist aber in der Kristallstruktur durchaus auffällig, dass besonders die Arginin-Reste, aber auch viele Lysin-Reste auf der Oberfläche von sauren Domänen umgeben sind und somit durch die negative Ladung der sauren Aminosäuren abgeschirmt werden. In der in Abbildung 37 gezeigten Kristallstruktur von Chymotrypsin sind an der unteren rechten Seite zwar drei von sauren Domänen freie und gut zugängliche Lysin-Reste vorhanden, aber wahrscheinlich können diese nur mit einer oder zwei BP-Einheiten des

Rezeptorlipids gebunden werden, wodurch dann auch die schwache Bindung zustande kommt. Auch in den Fluoreszenztitrationen wurde für Chymotrypsin nur eine geringe Bindungsfähigkeit beobachtet.



**Abbildung 78:** Kaum bindende Proteine mit höchster gemessener Konzentration ( $1 \mu\text{M}$ ) auf **11/SOPC** 10:90 Lipiddoppelschicht.

**Tabelle 7:** Ergebnisse der RfS-Titrationen der kaum bindenden Proteine auf Lipiddoppelschichten **11/SOPC** 10:90.

	pl	MW [kDa]	reversibel		irreversibel	
			$K_a$ [ $\text{M}^{-1}$ ]	$K_D$ [M]	$k_a$ [ $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	$k_d$ [ $\text{s}^{-1}$ ]
<b>Chymotrypsin</b>	8.5	25.3	$6.0 \cdot 10^6$	$1.7 \cdot 10^{-7}$	$1.6 \cdot 10^4$	$7.2 \cdot 10^{-4}$
<b>ADH</b>	5.6	141.0	$2.2 \cdot 10^6$	$4.4 \cdot 10^{-7}$	$4.2 \cdot 10^3$	$2.4 \cdot 10^{-4}$
<b>HSA</b>	5.8	66.0	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
<b>BSA</b>	5.8	66.0	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.

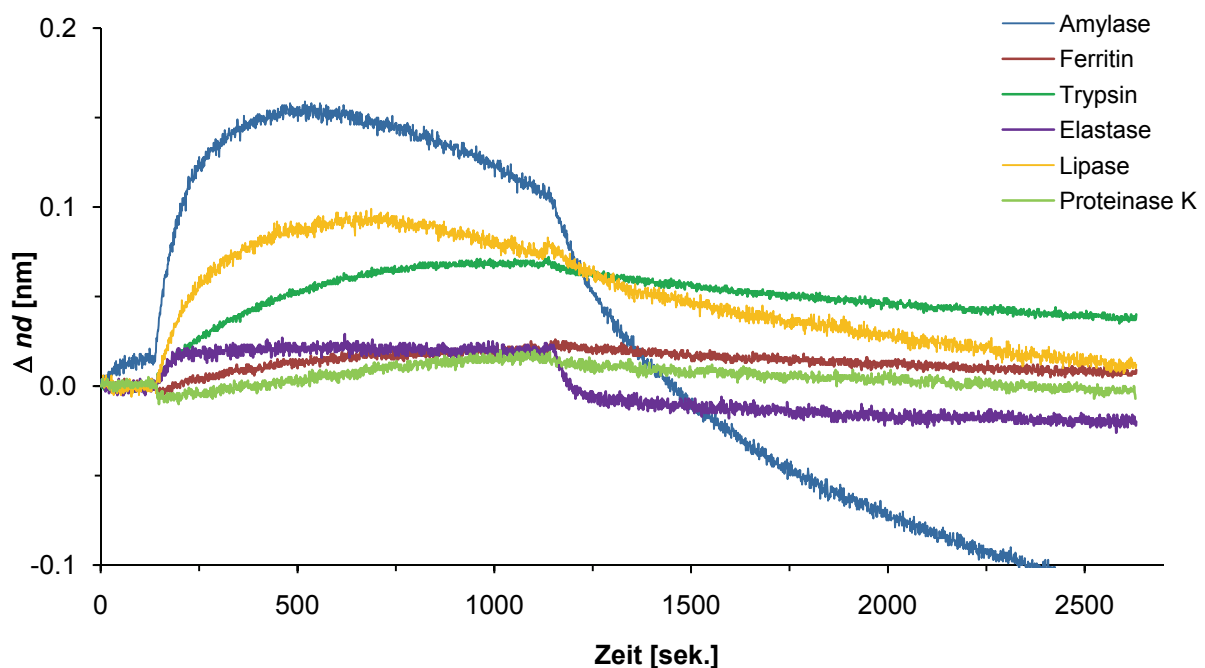
n. b. = nicht bestimmt

Die drei anderen sauren Proteine (HSA, BSA und ADH) tragen viele negative Ladungen auf der Oberfläche, wodurch eine Abstoßung zum Rezeptor erfolgen sollte. Dass diese Proteine trotzdem äußerst schwach, aber sogar zum Teil irreversibel, wenn auch auf sehr niedrigem Niveau, auf der mit **11** funktionalisierten

Oberfläche binden können, liegt beim ADH vermutlich an der enormen Größe und der damit verbundenen Anzahl von basischen Aminosäuren auf der Oberfläche.

Wechselwirkungen von Proteinen mit einer Oberfläche, wie z.B. einer künstlichen Membran (Lipiddoppelschicht) durch elektrostatische und/oder hydrophobe Bindungsanteile sind eher die Regel als die Ausnahme. Besonders die beiden Proteine HSA und BSA sind für Wechselwirkungen mit nahezu jeder Oberfläche bekannt<sup>[235]</sup>. Deswegen ist es schon bemerkenswert, dass eine Bindung von BSA und HSA auf der mit **11** dotierten Oberfläche nur so klein ausfällt. Für die Bindung der beiden Albumine konnten keine einheitlichen Bindungskonstanten ermittelt werden.

Die vierte und letzte Klasse der untersuchten Proteine bilden demnach die nicht-bindenden Proteine. Dazu zählen Amylase, Ferritin, Trypsin, Elastase, Lipase und Proteinase K (Abbildung 79). Die sauren Proteine mit pI-Werten zwischen 5.4 und 6.0 (Ferritin, Lipase und Amylase) zählen, wie erwartet, zu dieser Gruppe. Der hohe negative Ladungsüberschuss (Abbildung 36) führt zu einer Abstoßung zwischen Rezeptor und Protein.



**Abbildung 79:** Nichtbindende Proteine mit höchster gemessener Konzentration (1  $\mu$ M) auf **11**/SOPC 10:90 Lipiddoppelschicht.



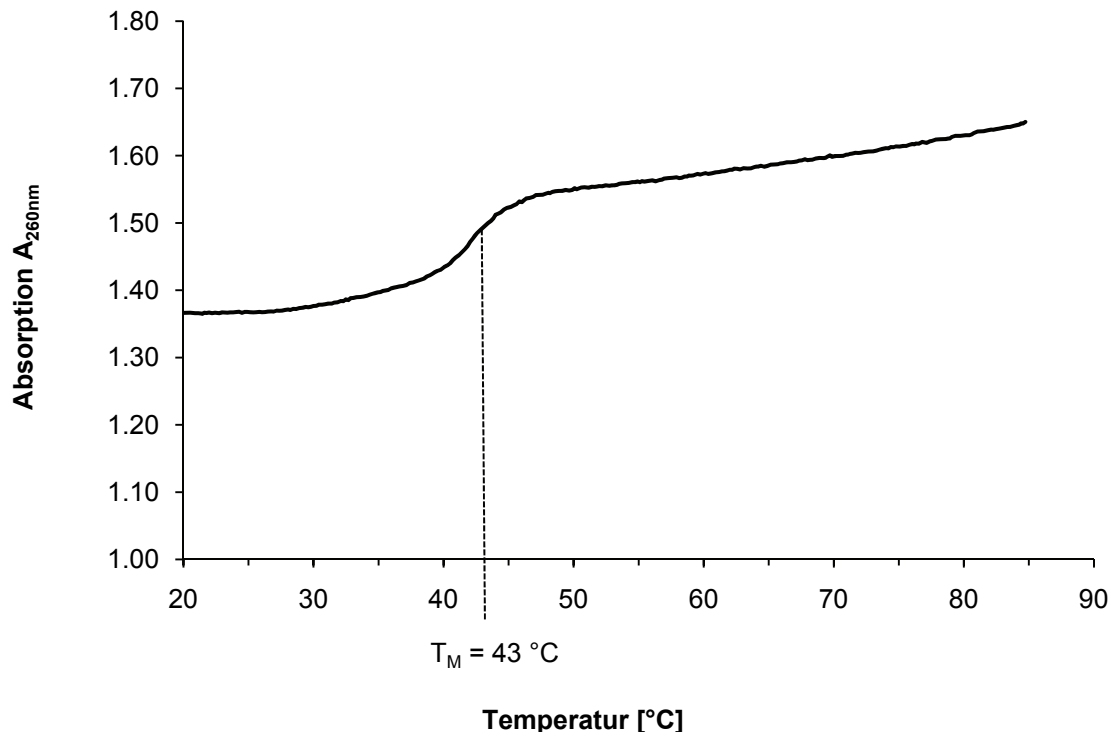
Für die schwache Bindung, die bereits bei den Fluoreszenztitrationen für das weitestgehend neutrale Protein Proteinase K ( $pI = 7.7$ ) bestimmt wurde ( $K_a$  von  $10^3 \text{ M}^{-1}$ ), wird auf der Oberfläche keine Bindung beobachtet. Das könnte an der gleichmäßigen Verteilung von positiven und negativen Ladungen auf der Oberfläche liegen, so dass keine Bindungsdomänen vorliegen. In der Lösung kann ein Rezeptor an einer Stelle wahrscheinlich eine Bindung zu ein bis zwei basischen Aminosäuren, ohne Wechselwirkung mit sauren Aminosäuren, eingehen. Auf der Oberfläche ist dies anscheinend aufgrund der Nähe der einzelnen Rezeptoren nicht möglich.

Die beiden basischen Proteine Trypsin ( $pI = 8.3$ ) und Elastase ( $pI = 8.7$ ) zeigen erstaunlicherweise keine Wechselwirkung mit dem eingelagerten Rezeptor **11**. Gerade für das sehr argininreiche Trypsin, mit den 21 positiven Überschussladungen, ist es sehr überraschend, dass keine Bindung stattfindet. Eine Erklärung für dieses Phänomen kann nicht gegeben werden. Trypsin ist ein basisches Protein mit einer großen positiven Ladung. Es enthält auf der Oberfläche eine basische Domäne und eine saure Domäne, die weitestgehend durch einen neutralen Oberflächenbereich voneinander separiert sind, so dass keine Abstoßung stattfinden kann. Eigentlich sollte Trypsin einen idealen Bindungspartner für das Rezeptorlipid darstellen. Für die Elastase, mit neun positiven Überschussladungen, sind die basischen und sauren Aminosäuren gleichmäßig über die gesamte Proteinoberfläche verteilt, so dass bei Bindung des Rezeptors immer auch eine Abstoßung durch benachbarte saure und damit negativ geladene Aminosäuren stattfindet, wodurch eine Bindung auf der funktionalisierten Oberfläche verhindert wird.

Abschließend kann gesagt werden, dass die basischen untersuchten Enzyme irreversibel, oder zumindest teilweise irreversibel binden, mit Ausnahme von Trypsin und Elastase, für die diese Abweichung allerdings erklärt werden kann. Die starke Bindung des Arginin-getaggt MBP entspricht den Erwartungen, nach der Untersuchung der Oligoarginin-Peptide. Die Bindung beim MBP wird eindeutig nur durch die rekombinante Expression des Arg-Tags verursacht. Neutrale und basische Proteine binden wenig bis kaum, was ebenfalls so erwartet wurde. Eine Ausnahme dabei bildet das saure Casein, für das aber eine Bindung über die Phosphate gefunden wurde.

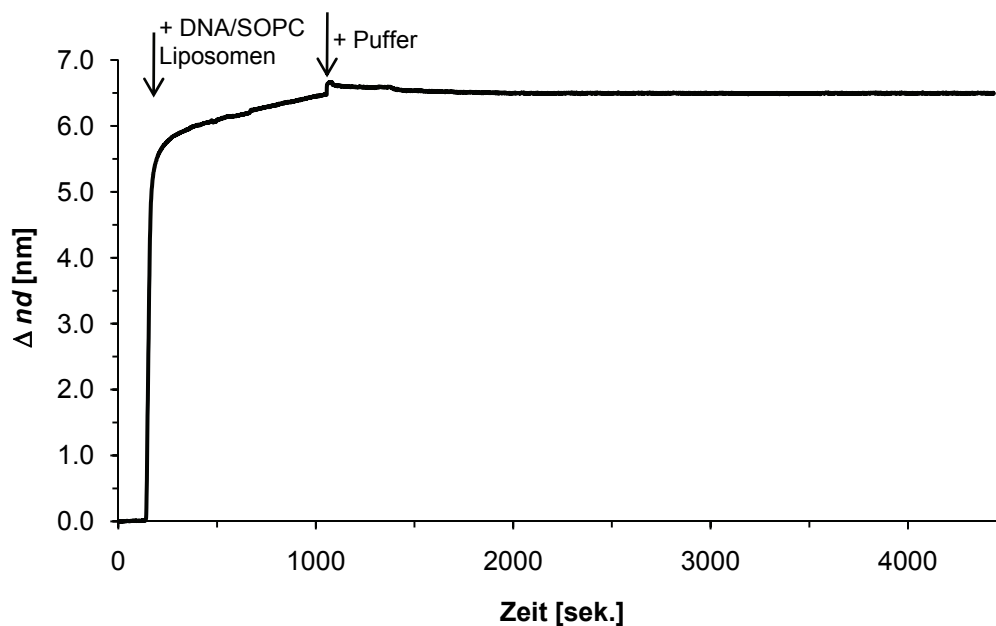
Da auch DNA dafür bekannt ist, mit basischen Aminosäuren, dabei insbesondere mit der Aminosäure Arginin, in Wechselwirkung zu treten, wurden die nächsten Untersuchungen nicht auf einer mit Rezeptorlipid **11** dotierten SOPC-Lipiddoppelschicht durchgeführt, sondern auf einer mit 3'-Cholesterol-ds-30 Basenpaar-DNA dotierten Lipiddoppelschicht, bestehend aus 90 % SOPC und 10 % ds-DNA.

Dazu wurden zuerst die beiden einzelnen komplementären DNA-Stränge, davon ein Strang mit dem Lipidanker (Cholesterol) funktionalisiert, hybridisiert, wie es im experimentellen Teil dieser Arbeit beschrieben ist. Dass die Hybridisierung erfolgreich war, und auch wirklich eine Doppelstrang-DNA vorliegt, wurde über die thermische Denaturierung des Doppelstrangs mittels UV/vis-Spektroskopie bei einer Absorption von 260 nm überprüft (Schmelzpunktbestimmung der DNA). Der erhaltene Schmelzpunkt liegt bei 43 °C und damit in guter Übereinstimmung mit Werten, die für 30 Basenpaar-Doppelstrang-DNA erhalten werden (Abbildung 80).



**Abbildung 80:** Schmelzkurve der 30 Basenpaar-ds-DNA.

Die so erhaltene Doppelstrang-DNA, die einen Lipidanker trägt, wird mittels der Extrusionsmethode in Liposomen eingeführt, mit denen ganz analog, wie für das Rezeptorlipid **11** beschrieben, Lipiddoppelschichten auf Glasträgern über die Vesikelfusionsmethode erhalten werden (Abbildung 81). Dabei sind die erhaltenen Lipiddoppelschichten mit einer optischen Schichtdicke von ungefähr 6 bis 6.5 nm etwas dicker, als die mit **11** dotierten Lipiddoppelschichten.

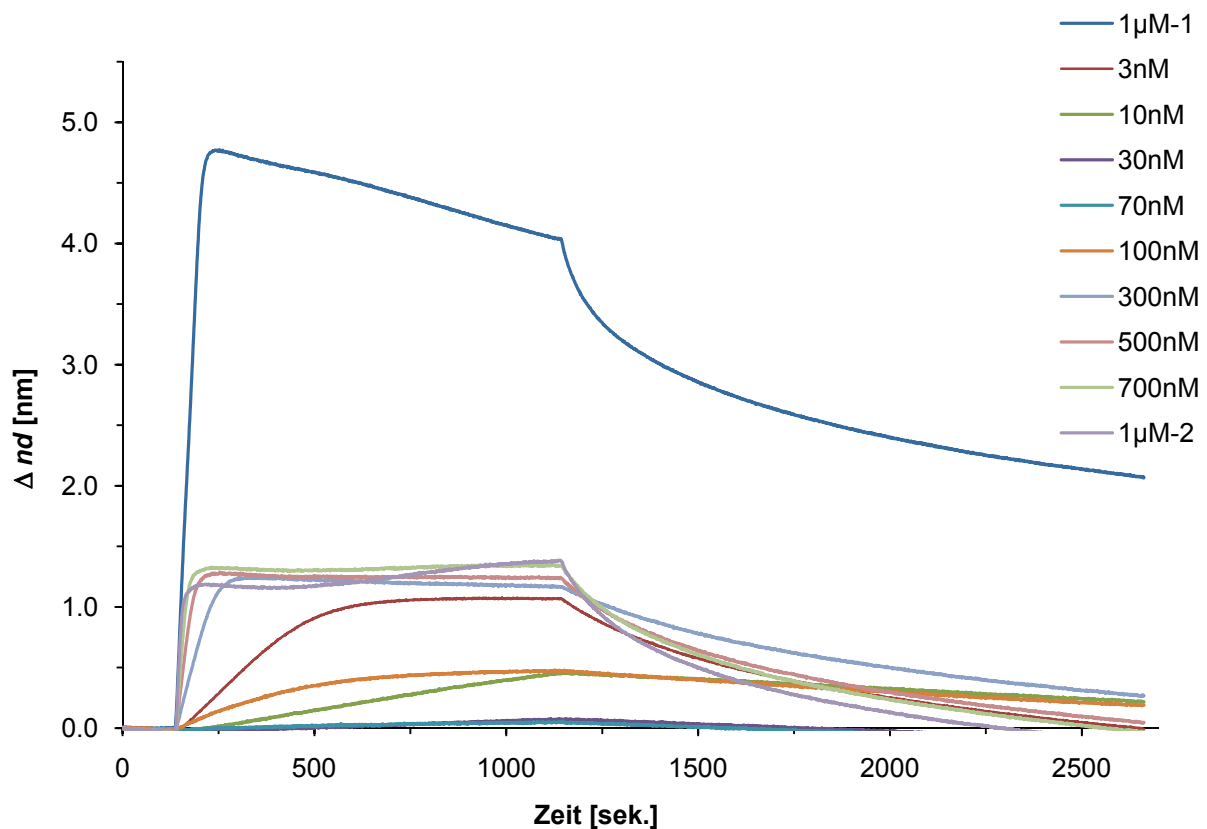


**Abbildung 81:** Bildung der Lipiddoppelschicht aus SOPC, dotiert mit 10 % 3'Cholesterol-ds-DNA (DNA/SOPC 10:90).

Nachdem eine stabile Lipiddoppelschicht auf dem Glasträger durch Vesikelfusion erhalten wurde, und diese auch über einen längeren Zeitraum beim Spülen mit Puffer stabil bleibt, wurde genauso verfahren, wie bei den Messungen auf der Lipiddoppelschicht, bestehend aus dem Rezeptorlipid **11** und SOPC. Da auch bei der Chol-ds-DNA das gleiche Konzentrationsverhältnis zwischen SOPC und Rezeptor (DNA) gewählt wurde, wie beim Rezeptorlipid **11**, nämlich eine 10 %ige Dotierung, können beide Rezeptoren direkt verglichen werden.

Die RfS-Titration von MBP-R10 auf einer mit Chol-ds-DNA dotierten Lipiddoppelschicht, ist in Abbildung 82 gezeigt. Für diese Messungen konnten keine Bindungskonstanten bestimmt werden. Die Dissoziationsratenkonstante, welche die Kinetik

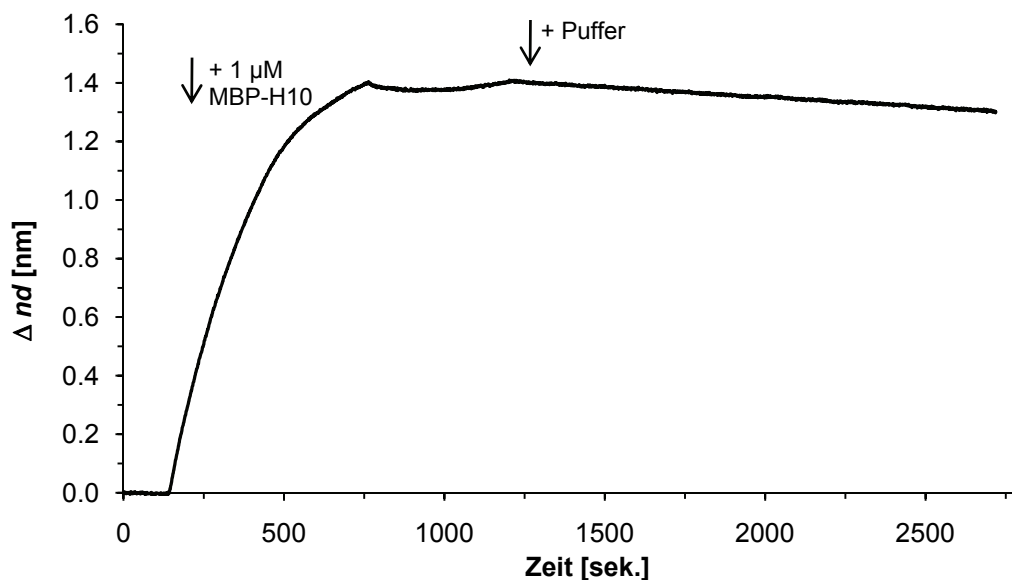
der Dissoziation beschreibt, konnte durch Fitten der Dissoziationsphase mit dem Programm *BIAevaluation* auf einen Wert von  $k_d = 2.6 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  bestimmt werden. Im Vergleich dazu zeigt MBP-R10 auf einer mit **11** dotierten Lipiddoppelschicht eine Dissoziationsratenkonstante von  $k_d = 1.6 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ . Die Dissoziationsratenkonstante auf Chol-ds-DNA ist um eine Größenordnung kleiner, wodurch eine stärkere Bindung des Proteins an die DNA, als an den Rezeptor **11** angezeigt wird. Auch der Vergleich der höchsten Konzentration von MBP-R10 auf Cholesterol-ds-DNA ( $1 \mu\text{M}$ -1) zeigt einen größeren irreversiblen Bindungsanteil, als Rezeptor **11**. Bei der DNA bleibt fast doppelt soviel Protein irreversibel gebunden (ungefähr 2.0 nm), als auf mit **11** funktionalisierter Lipidschicht irreversibel immobilisiert bleiben (ungefähr 1.2 nm Protein). Dabei ist der Anstieg der optischen Schichtdicke für den reversiblen Bindungsanteil (Bindungsamplitude) für beide Oberflächen ähnlich (ca. 4.5 nm).



**Abbildung 82:** *RfS-Titration von MBP-R10 in angegebenen Konzentrationsschritten auf Chol-ds-DNA/SOPC 10:90 funktionalisierter Lipiddoppelschicht.*

Nur bei dem ersten Titrationsschritt wird eine große Menge an Protein immobilisiert, anschließend scheinen fast alle DNA-Rezeptorplätze auf der Oberfläche besetzt zu sein, da fast keine weitere Zunahme der Bindung erkennbar ist.

Um die Bindung des MBP-R10 eindeutig für die Bindung der Chol-ds-DNA an den Arginin-Tag zu belegen, wurde das gleiche Experiment, wie schon beim Rezeptorlipid **11** durchgeführt. Auf einer mit DNA dotierten Lipiddoppelschicht wird 1  $\mu\text{M}$  MBP-H10 über die Oberfläche gespült. Sollte die Bindung des MBP-R10 wirklich nur auf die Bindung am Tag zurückzuführen sein, sollte auch bei der DNA keine Bindung stattfinden. Das ist jedoch, wie in Abbildung 83 gezeigt, nicht der Fall. Auch das MBP-H10 bindet sehr stark an die DNA-dotierte-Oberfläche, und dabei komplett irreversibel. Dies kann nicht auf elektrostatische Wechselwirkungen, wie zwischen DNA und dem 10er Arginin-Tag des MBP-R10 zurückgeführt werden, da der 10er Histidin-Tag bei einem pH-Wert von 7.5 nicht positiv geladen vorliegt.

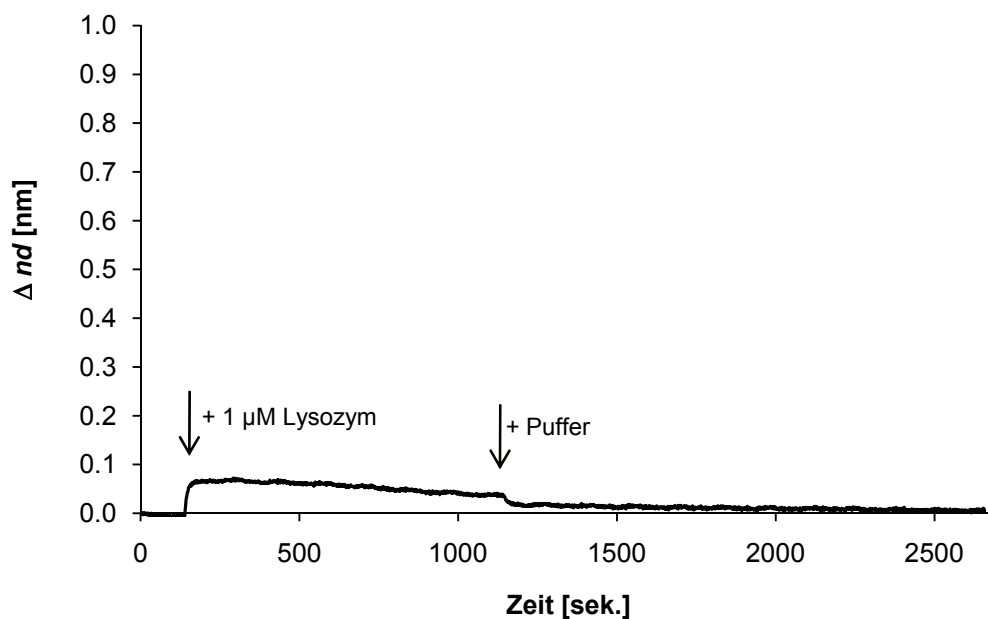


**Abbildung 83:** 1  $\mu\text{M}$  MBP-H10 immobilisiert auf Chol-ds-DNA/SOPC 10:90 funktionalisierter Lipiddoppelschicht.

Der irreversible Bindungsanteil von MBP-R10 auf der DNA-dotierten Oberfläche (Abbildung 82), ist also nicht nur auf die Wechselwirkung mit dem Arginin-Tag zurückzuführen. Anscheinend sind auch ungefähr 1.2 nm an optischer Schichtdicke durch unspezifische Wechselwirkungen durch das Protein (ohne den Einfluss des Tags) auf der Oberfläche immobilisiert geblieben. Von den 2.0 nm der irreversibel immobilisierten optischen Schichtdicke müssen also 1.1 nm für die unspezifische Bindung abgezogen werden, so dass nur noch eine Immobilisierung von 0.9 nm bezogen auf die Bindung des MBP-R10 durch den Arginin-Tag auf der Chol-ds-DNA

übrig bleibt. Demnach lässt sich also durch die Chol-ds-DNA weniger MBP-R10 am Arginin-Tag spezifisch auf der Oberfläche binden, als dies durch das Rezeptorlipid **11** möglich ist, womit nur eine spezifische Bindung stattfindet. Durch diese unspezifischen Wechselwirkungen können auch die Dissoziationsratenkonstanten der DNA und **11** für die MBP-R10 Dissoziationskinetik nicht mehr verglichen werden, da diese Werte unterschiedliche Bindungseigenschaften und Bindungsmodi erfassen. Wahrscheinlich ist auch der große Anteil an unspezifischer Wechselwirkung des MBP auf der DNA-dotierten Oberfläche der Grund, warum keine Bindungskonstanten für das MBP-R10 bestimmt werden konnten.

Als nächstes wurden die Bindungseigenschaften einiger Proteine auf der mit DNA-dotierten Lipidoberfläche untersucht. Dazu wurde jeweils eine 1  $\mu$ M Proteinlösung über die mit Chol-ds-DNA dotierte SOPC-Oberfläche gespült. Für das argininreiche Lysozym konnte nur eine ganz geringe und dabei komplett reversible Bindung an die DNA gefunden werden (Abbildung 84).

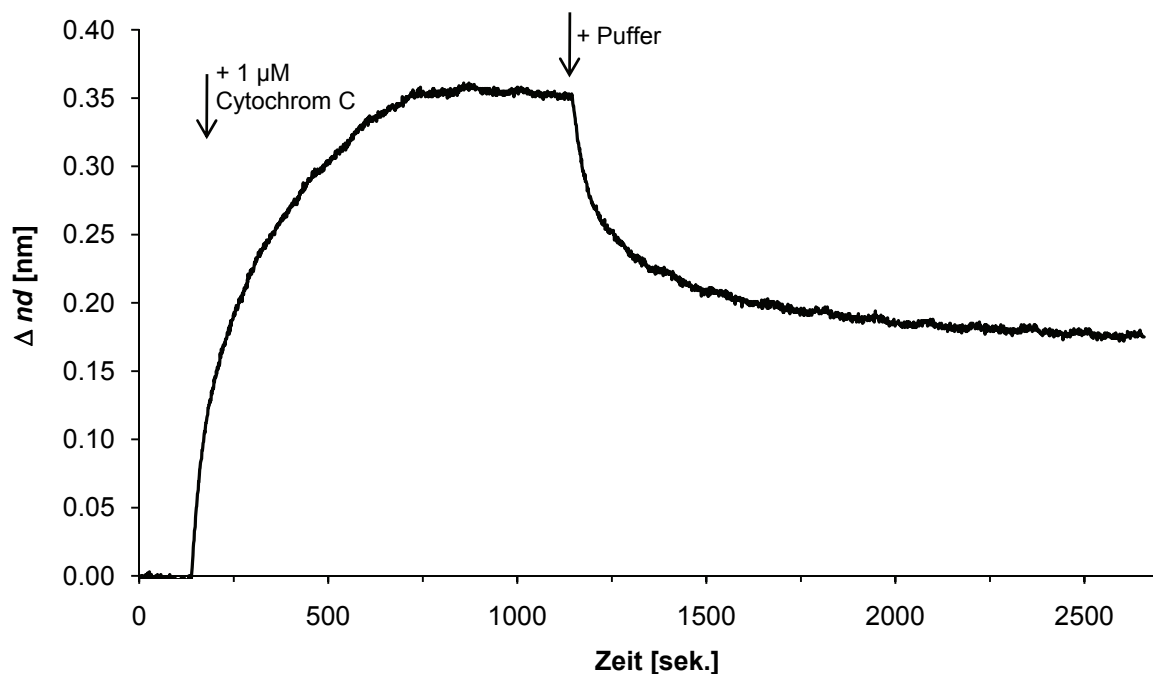


**Abbildung 84:** 1  $\mu$ M Lysozym immobilisiert auf Chol-ds-DNA/SOPC 10:90 funktionalisierter Lipiddoppelschicht.

Obwohl Lysozym positive Ladungen auf der Oberfläche trägt, findet keine Wechselwirkung mit der negativ geladenen DNA statt. Anscheinend ist die DNA nicht flexibel genug, um starke Multipunktwechselwirkungen an der Oberfläche des

Proteins einzugehen. Obwohl beim Lysozym viele basische Aminosäuren gleichmäßig auf der gesamten Oberfläche verteilt sind, ist es anscheinend nicht möglich, mit dem ds-DNA-Strang nur bindende Wechselwirkungen einzugehen. Das liegt vermutlich auch an den negativen Ladungen auf der Proteinoberfläche, die einer Bindung durch ihre abstoßend wirkenden negativen Ladungen entgegenwirken. Dies ist bei Rezeptor **11** ganz anders. Die drei BP-Rezeptoreinheiten können durch ihre Flexibilität gezielt basische und damit positiv geladene Aminosäuren auf der Oberfläche ansteuern, anders als die starre DNA-Helix, mit der großen negativen Ladung. Zudem können mehrere Rezeptoren gezielt am Protein angreifen.

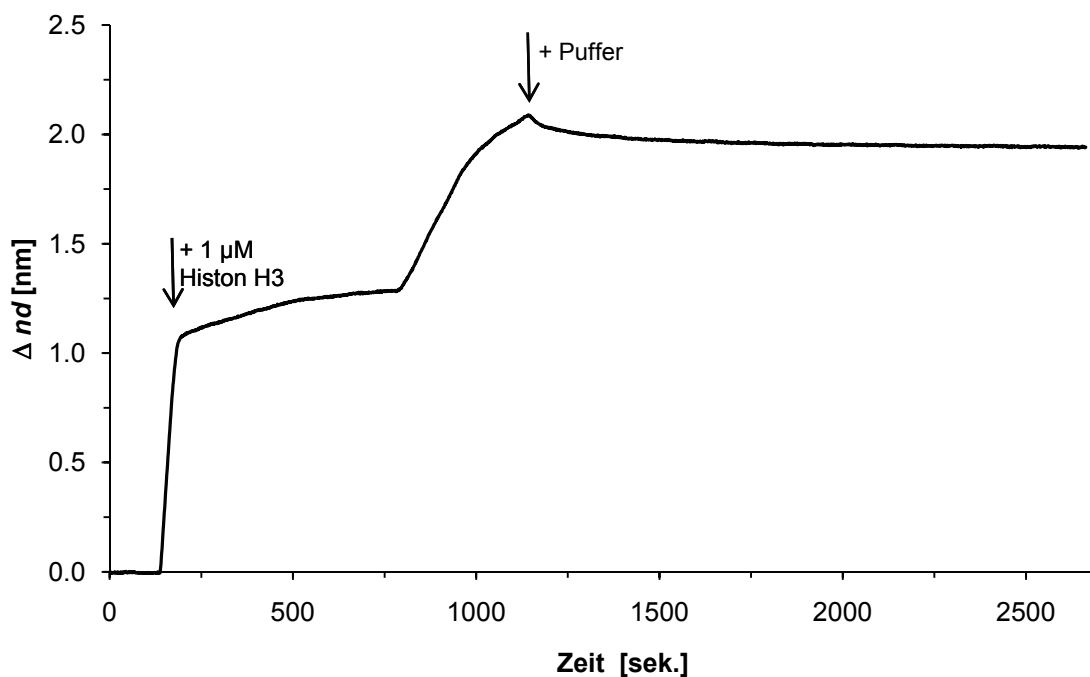
Auch für das vom pI-Wert und von der Größe vergleichbare Cytochrom C wird keine, mit dem Rezeptor **11** vergleichbare Bindung auf der DNA-dotierten Oberfläche erreicht (Abbildung 85). Beim Cytochrom C ist ungefähr die Hälfte der Bindung irreversibel (0.2 nm), während mit Rezeptor **11** nur  $\frac{1}{4}$  der Bindung reversibel ist und ungefähr das Doppelte an optischer Schichtdicke (0.45 nm) auf der Oberfläche irreversibel gebunden bleibt.



**Abbildung 85:** 1  $\mu$ M Cytochrom C immobilisiert auf Chol-ds-DNA/SOPC 10:90 funktionalisierter Lipiddoppelschicht.

Die Gründe für die schlechtere Bindung von Cytochrom C an die ds-DNA, im Gegensatz zum Rezeptor **11**, sollten die Gleichen sein, wie schon für das Protein Lysozym erläutert. Auch hier könnte die größere Flexibilität des Rezeptors durch das Cyclamgerüst und die Spacer, an denen die BP-Rezeptoreinheiten befestigt sind, den Vorteil gegenüber der starren DNA-Helix ausmachen. Für beide Messungen kann auch die Schwächung der Bindung durch die große Salzkonzentration (150 mM NaCl) nicht ausgeschlossen werden. Dadurch werden rein elektrostatische Wechselwirkungen, die vermutlich bei der Wechselwirkung zwischen basischen Proteinen und DNA die Hauptrolle spielen, enorm verringert oder gar ausgeschlossen.

Die komplett irreversible Bindung des DNA-Bindeproteins Histon H3 ist auf der mit 10 % ds-DNA dotierten SOPC-Oberfläche von einer Besonderheit geprägt (Abbildung 86). Während der Injektion des Proteins wird zuerst eine Sättigung bei ca. 1.25 nm optischer Schichtdicke erreicht, bevor ein weiterer Anstieg an optischer Schichtdicke auf 2.0 nm beobachtet wird, der auch beim Spülen mit Puffer irreversibel gebunden bleibt.

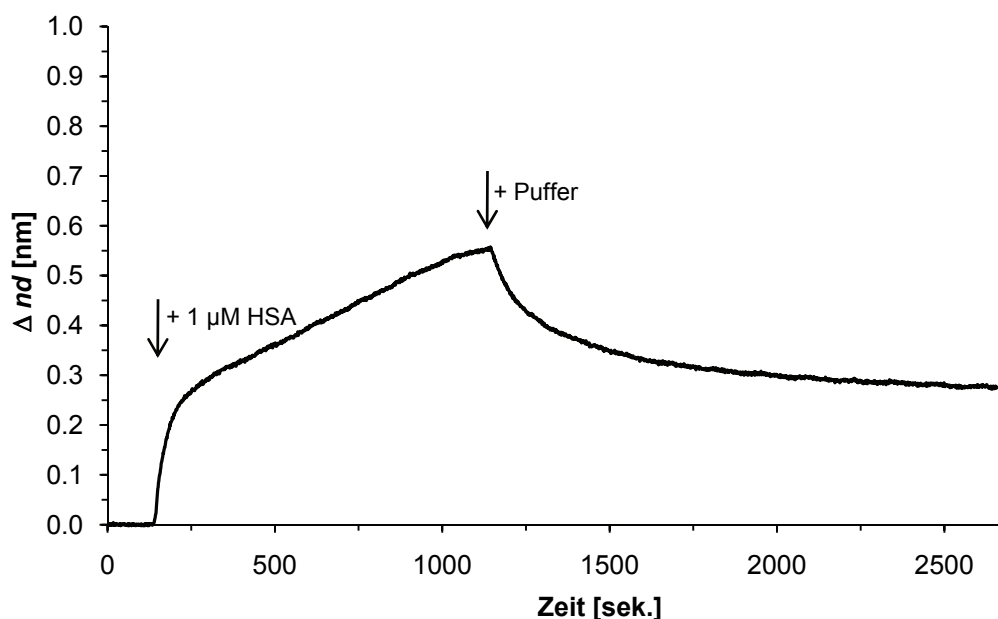


**Abbildung 86:** 1  $\mu$ M Histon H3 immobilisiert auf Chol-ds-DNA/SOPC 10:90 funktionalisierter Lipiddoppelschicht.



Anscheinend lagert sich erst soviel Histon H3 auf der DNA-Oberfläche ab, bis diese vollständig vom Protein bedeckt ist. Dann könnten zwei verschiedene Wege eingeschlagen werden. Zum einen gäbe es die Möglichkeit, dass das Histon H3 auf der Oberfläche größere Aggregate bildet (Histon-Octamere). Dies ist aber unwahrscheinlich, da dieses Phänomen auf der mit **11** dotierten Oberfläche so nicht beobachtet werden konnte. Aus diesem Grund ist es wahrscheinlicher, dass der Verlauf der Bindungskurve durch eine Wechselwirkung mit der ds-DNA zustande kommt. Hätte dieser Verlauf der Bindungskurve nichts mit der ds-DNA zu tun, müsste das gleiche Ergebnis auch für die mit **11** dotierte SOPC-Oberfläche erhalten werden. Als mögliche Erklärung sollte auch hier, wie schon bei der Bindung von DNA auf immobilisiertem Histon (Abbildung 65), die Bildung eines Nukleosoms sein. Wahrscheinlich bindet erst ein gewisser Anteil von Histon H3 auf der ds-DNA, wobei das Protein zwischen die DNA-Stränge passt und sich zwischen diese schiebt, um so eine nukleosomähnliche Struktur auszubilden. Die positiven Ladungen auf dem Histon H3 werden so von der DNA teilweise abgeschirmt, wodurch es möglich ist, nochmals Histon H3 auf der Oberfläche anzulagern. Das so gebundene Histon H3 ist durch die Vielzahl der Wechselwirkungen dann irreversibel auf der Oberfläche gebunden. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass sich durch Konformationsänderung eine Erhöhung der optischen Schichtdicke ergibt. Zuerst würde sich etwas Histon H3 anlagern (erster Anstieg) und sich die DNA beginnen um das Histon zu winden (erstes Plateau), da es rundherum mit vielen positiven Ladungen besetzt ist. Durch immer weitere Verdichtung, unter Ausbildung von Überstrukturen auf der Oberfläche, könnte der zweite Anstieg der optischen Schichtdicke gekennzeichnet sein, bis zum Erreichen des zweiten Plateaus, welches auch beim Spülen mit Puffer erhalten bleibt. Da die Bindung sehr stabil ist, sind beim Histon H3 Wechselwirkungen mit mehreren DNA-Strängen auf der Oberfläche wahrscheinlich. Doch auch die Bindung von Histon auf der mit Rezeptorlipid **11** belegten Lipiddoppelschicht ist stärker, als die Bindung auf der ds-DNA. So wird auf der mit **11** dotierten Oberfläche eine optische Schichtdicke von 3.0 nm des Histon H3 immobilisiert, während auf der DNA dotierten Oberfläche nur 2.0 nm an optischer Schichtdicke von Histon H3 abgeschieden werden. Auch für das Histon H3, was eine große Affinität zu ds-DNA hat, ist eine stärkere Bindung auf mit **11** dotierten Oberflächen beobachtet worden, als auf mit ds-DNA dotierten Lipidschichten. Hier zeigt sich wieder das große Leistungspotential des synthetisierten Rezeptors **11**.

Die Bindung des HSA auf der mit ds-DNA dotierten Oberfläche zeigt einen ähnlichen Verlauf, wie auf Rezeptorlipid **11**, weswegen hier auch von unspezifisch mit der DNA eingegangenen Wechselwirkungen ausgegangen werden kann. Es ist bekannt, dass für Albumine eine Wechselwirkung mit vielen organischen Materialien die Regel ist<sup>[235]</sup>. Auch auf der DNA bleiben, wie beim Rezeptor **11**, ungefähr 0.3 nm des Proteins, gemessen in optischer Schichtdicke, irreversibel auf der Oberfläche gebunden. Beachtlich hierbei ist, dass eine Bindung von HSA auf einer reinen SOPC-Oberfläche nicht stattfand, sondern erst eine geringe Bindung festzustellen ist, wenn DNA, oder Rezeptor **11** auf der Oberfläche exponiert sind.

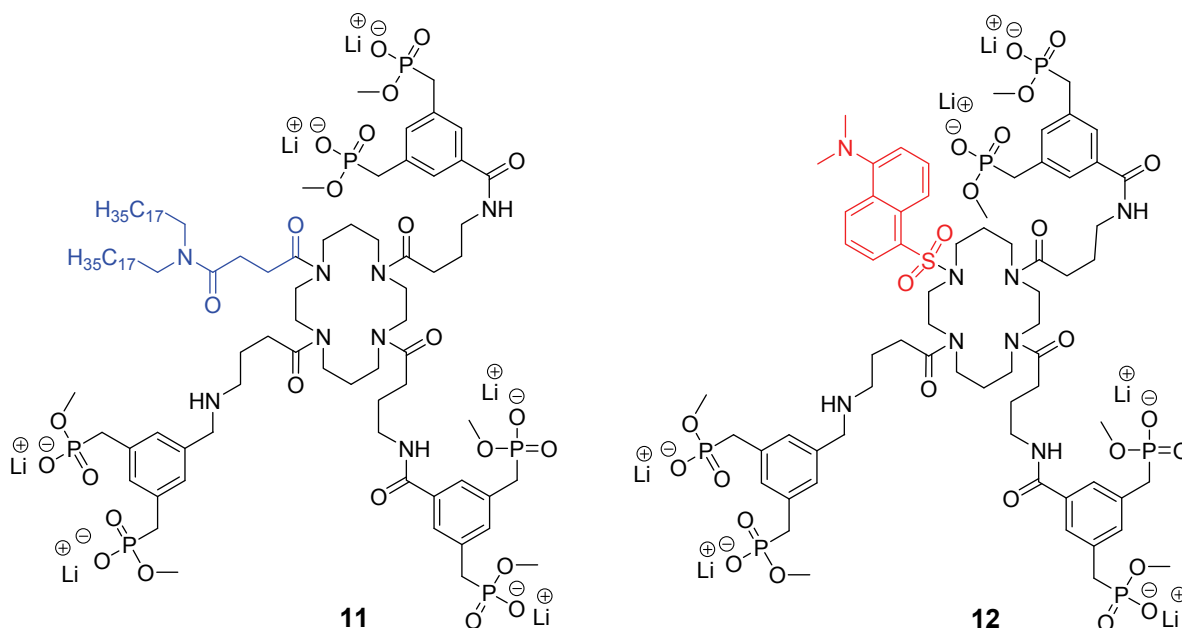


**Abbildung 87:** 1 μM HSA immobilisiert auf Chol-ds-DNA/SOPC 10:90 funktionalisierter Lipiddoppelschicht.

Auch wenn der DNA als Rezeptor für Arginine herausragende Eigenschaften zugesprochen werden, müssen auf der Oberfläche und im Vergleich zum Rezeptor **11** einige Einschränkungen gemacht werden. So bindet MBP-R10 auf den ersten Blick besser auf der DNA-dotierten Lipidschicht, als auf der mit **11** dekorierten Lipidschicht. Betrachtet man aber auch den großen Anteil von unspezifischen Wechselwirkungen, die trotz der großen Salzkonzentration von 150 mM NaCl und der großen Pufferkonzentration (20 mM HEPES) ein so großes Ausmaß annehmen, ist der synthetisierte Rezeptor der immobilisierten DNA bei weitem überlegen.

## 4. Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Rezeptoren zur Erkennung und Immobilisierung von Arginin-getaggtten und basischen Proteinen auf lipidischen Oberflächen (Lipiddoppelschichten) synthetisiert. Arginin-getaggte Proteine tragen eine rekombinant eingeführte Domäne, bestehend aus einem Oligoarginin-Peptid, das wie ein Bindungsanker wirken soll. Basische Proteine weisen eine positive Ladung und einen basischen pI-Wert auf, der durch die große Anzahl von Arginin- und Lysinresten auf der Proteinoberfläche verursacht wird. Als Rezeptoreinheit wurde hier das schon bekannte und von *T. Schrader* entwickelte Bisphosphonat (BP) eingesetzt, das auch schon in der Vergangenheit als Erkennungseinheit für Arginine und Lysine benutzt wurde. Da die Bindungsstärke in wässrigen Medien für ein Bisphosphonat-Bindungsmotiv sehr klein ist, wurde das Prinzip der Multivalenz ausgenutzt und drei Bindungseinheiten in einem Rezeptormolekül vereint. Da die Untersuchungen auf lipidischen Oberflächen stattfinden sollten, wurde das Molekül mit einem Lipidanker versehen, um es in Lipiddoppelschichten einlagern zu können. Dafür wurde das Rezeptorlipid **11** erfolgreich synthetisiert. Um weitere Untersuchungen in Lösung durchführen zu können, wurde das analoge Rezeptormolekül mit einem Fluoreszenzlabel anstelle des Lipidankers, als Fluoreszenzrezeptor **12**, synthetisiert.



Durch die flexible Struktur des makrocyclischen Cyclamgrundgerüsts wurde mittels Molecular Modelling gezeigt, dass alle drei Rezeptoreinheiten in eine Richtung zeigen und so alle Bisphosphonate zur Bindung beitragen können, um das Prinzip der Multivalenzen auch optimal ausnutzen zu können.

In ersten Studien auf Stearinsäuremonoschichten (SAM) konnte mit der Filmwaagetechnik an der Luft-Wasser-Grenzfläche gezeigt werden, dass sich das Molekül **11** sehr effektiv in lipidische Monoschichten einlagern kann. Auch die Erkennung von kurzen Oligoarginin- und Oligolysin-Peptiden, die in der Subphase gelöst wurden, konnte schon in geringen Konzentrationen (500 nM) beobachtet werden. Dabei zeigte sich eine Reihenfolge der größten Wechselwirkungen vom kurzen Diarginin über Triarginin und Hexaarginin zum Tetraarginin. Das Tetraarginin zeigte, ebenso wie das Tetralysin, die größten Wechselwirkungen mit dem Rezeptor. Dies wird erst auf den zweiten Blick logisch, nachdem die Bindungsstöchiometrien mittels Fluoreszenztitrationsen mit dem Fluoreszenzrezeptor **12** und den Arginin-Peptiden durchgeführt wurden. So wurde gefunden, dass Di- und Triarginin mit dem Rezeptor einen 3:1-Komplex bilden, jedes BP bindet ein Peptid. Hexaarginin bildet einen 1:1-Komplex aus, wobei jedes BP eines Rezeptors an einem Peptid angreift, woraus eine stärkere Bindung resultiert. Tetraarginin hingegen kann aufgrund der optimalen Länge mit zwei Rezeptoren gleichzeitig wechselwirken und einen 5:2-Komplex ausbilden, was die großen Effekte auf der Oberfläche erklärt. Tetralysin zeigt den gleichen Effekt, der aber mit einer etwas kleineren Flächenaufweitung einhergeht, wodurch die Argininselektivität der BP-Pinzette bestätigt wird. Auch Proteine, die in der Subphase gelöst wurden, können schon in sehr kleinen Konzentrationen erkannt werden. So wird Lysozym im Bereich von 0.2 nM bis 200 nM deutlich erkennbar gebunden. Auch Cytochrom C wird vom Rezeptorlipid **11** an der Luft-Wasser-Grenzfläche deutlich gebunden, wenn auch die Effekte für das lysinreiche Cytochrom C etwas kleiner sind, als für das argininreiche Lysozym.

Wie schon erwähnt, wurden mit Rezeptor **12** Fluoreszenztitrationsen durchgeführt, um die Eigenschaften des Rezeptors in Lösung untersuchen zu können. Dabei wurde in 20 mM HEPES-Puffer mit physiologischer Salzkonzentration (150 mM NaCl) gemessen. Bei der Titration mit den Peptiden wurden, wie oben erwähnt, die Bindungsstöchiometrien ermittelt. Auch bei den Fluoreszenztitrationsen wurde eine Reihenfolge in der Bindungsstärke, abhängig von der Peptidlänge, erhalten. Dabei

hat das Hexaarginin-Peptid die größte Assoziationskonstante mit  $K_a = 1.05 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ . Für die kleinen Peptide Di- und Triarginin wurden Assoziationskonstanten, die eine Größenordnung unter der des Hexaarginin-Peptids liegen, bestimmt. Die Bindungszunahme mit steigender Peptidlänge wurde im Molecular Modelling mit Rezeptor **11a** und den Argininpeptiden Arg<sub>4</sub>, Arg<sub>6</sub> und Arg<sub>10</sub> ebenfalls gezeigt. Die Proteine binden mit Assoziationskonstanten zwischen  $K_a = 1.25 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$  für Lysozym und der kleinsten  $K_a = 3.05 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$  für Chymotrypsin.

Für Untersuchungen auf Lipiddoppelschichten mit der Rlf-Spektroskopie gelang es, das Rezeptorlipid **11** in Liposomen mit dem Trägerlipid SOPC einzulagern, und diese erhaltenen Vesikel auf Glasträgern zur Fusion zu bringen, um so eine Lipiddoppelschicht (SLB) zu erhalten, die zu 10 % mit dem Rezeptor **11** funktionalisiert ist. Im Molecular Modelling wurde in idealisierter Weise gezeigt, dass die Rezeptoren auf der Oberfläche sehr dicht nebeneinander stehen, so dass von einer vollständig funktionalisierten Oberfläche ausgegangen werden kann und Multipunktwechselwirkungen von Proteinen mit mehreren Rezeptoren auf der Oberfläche möglich sind. Auch bei den RlfS-Messungen wurde mit 20 mM HEPES-Puffer mit physiologischer Salzkonzentration und physiologischem pH-Wert gemessen. Bei der Analyse der Peptide bestätigten sich die Ergebnisse aus den Untersuchungen an der Luft-Wasser-Grenzfläche und in Lösung. Diarginin und Triarginin haben ein zu kleines Molekulargewicht, um Bindungseffekte auf der Oberfläche detektieren zu können. Tetraarginin und Hexaarginin zeigen starke Bindungen, die beim Tetraarginin beinahe und beim Hexaarginin komplett irreversibel sind. So ist die Assoziationskonstante von Hexaarginin auf der Oberfläche mit einer  $K_a = 2.5 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$  um drei Größenordnungen größer, als in Lösung mit Fluoreszenztitrationen ermittelt wurde. Die Dissoziationskonstante von Hexaarginin liegt im nanomolaren Bereich ( $K_D = 5.6 \cdot 10^{-9} \text{ M}$ ). Die Konstanten von Tetraarginin liegen eine Größenordnung unter denen des Hexaarginins und die des Tetralysins nochmal eine unter denen des Tetraarginin-Peptids.

Die Immobilisierung der basischen Proteine (Histon H1, Histon H3, Papain) und dem Casein gelang auf der lipidischen Oberfläche komplett irreversibel. Dabei stellt das Casein eine Ausnahme dar, da es das Phosphat der Rezeptoren bindet und zum großen Teil auch schon eine Affinität zur nicht funktionalisierten SOPC-Lipidschicht zeigt, die auch Phosphate enthält. Die Funktionsfähigkeit des immobilisierten Histons

wurde geprüft, indem 20 Basenpaar-DNA auf diesem bindet. Versuche mit Kalbsthymus-DNA lösen 1/3 der immobilisierten Proteinmenge vom Rezeptor ab. Teilweise irreversibel ist die Bindung auf der funktionalisierten Oberfläche für die nächstbasischen Proteine Lysozym und Cytochrom C und die beiden Argininetaggetagten Proteine MBP-R10 und BR-R7. Dabei bindet das saure Protein MBP nur aufgrund der rekombinanten Einführung des Arginin-Tags. Eine Sonderstellung nimmt das membranständige BR ein, bei dem neben der Wechselwirkung mit dem Arginin-Tag auch noch Wechselwirkungen der Lipiddoppelschicht mit der Membran des BR berücksichtigt werden müssen. Die irreversible Bindung von MBP-R10 auf der Oberfläche mit einer Dissoziationskonstante von  $K_D = 7.3 \cdot 10^{-8}$  M, wurde über mehr als sieben Stunden gemessen und nach dieser Zeit die Bioaktivität des immobilisierten Maltosebindepoteins überprüft, indem das Substrat Maltose zugegeben wurde. Es konnte eine Bindung sowohl von Maltose, als auch von Maltodextrin an das immobilisierte Protein gezeigt werden, die eindeutig auf die Immobilisierung des Proteins in bioaktiver Form hinweist. Eine Verzehnfachung der Konzentration des zu immobilisierenden Proteins (von 1  $\mu$ M zu 10  $\mu$ M) zeigte für das MBP-R10 eine Verdopplung der immobilisierten Proteinmenge. Der irreversibel gebundene Anteil des MBP-R10 kann selbst in Konkurrenz mit 1 mM Hexaarginin-Peptid nicht von der Oberfläche gelöst werden. Jedoch reicht schon 1 M NaCl, um das Protein vollständig von der Oberfläche waschen zu können und die Bindung komplett reversibel zu machen. Aus diesem Grund ist es bemerkenswert, dass eine irreversible Immobilisierung von MBP-R10 bei 20 mM HEPES-Puffer und 150 mM NaCl gelungen ist, da die Bindung zwischen Arginin-Tag und Rezeptor hauptsächlich auf elektrostatischen Wechselwirkungen beruht und dabei insbesondere über einen so langen Zeitraum möglich ist. Saure Proteine zeigen zum großen Teil keine, oder nur geringe Bindungen auf der mit Rezeptorlipid **11** funktionalisierten Lipiddoppelschicht.

Untersuchungen auf mit 30 Basenpaar-ds-DNA dotierten Lipiddoppelschichten konnten erfolgreich durchgeführt werden, indem ein mit einem Lipidanker versehener DNA-Einzelstrang (3'-Cholesterol) mit einem komplementären DNA-Einzelstrang hybridisiert wurde. Der Schmelzpunkt der DNA wurde auf 43 °C bestimmt und die DNA in Liposomen eingelagert, um diese auf der Glasoberfläche zur Fusion zu bringen, und so die DNA-funktionalisierte Lipiddoppelschicht zu erhalten. MBP-R10 bindet sehr stark irreversibel an dieser DNA, aber hauptsächlich ist diese

Wechselwirkung auf unspezifische Bindungen, trotz des hohen Salzgehalts im Puffer, zurückzuführen. Andere basische Proteine binden, bis auf das Histon H3, nicht oder nur zu einem sehr geringen Anteil auf dieser Oberfläche.

In dieser Arbeit konnte also gezeigt werden, dass Bindungskonstanten auf Oberflächen um bis zu drei Größenordnungen, gegenüber denen in Lösung, ansteigen können. Das synthetisierte Rezeptorlipid zeigt starke Bindungseigenschaften auf dotierten Lipidoberflächen für basische und Arginin-getaggte Proteine, welche teilweise irreversibel immobilisiert werden können. Da das Bindungsmotiv des Bisphosphonats sehr stark auf elektrostatischen Wechselwirkungen beruht, zeigen die in dieser Arbeit durchgeführten Bindungsstudien unter physiologischen Bedingungen das enorme Bindungspotential des Rezeptorlipids **11**. Zudem konnte gezeigt werden, dass der irreversibel immobilisierte Anteil des MBP-R10 auch noch nach einigen Stunden auf der Oberfläche die bioaktive Form beibehält. Auch für Histon H3 konnte gezeigt werden, dass trotz der Immobilisierung die DNA-Bindungseigenschaften noch vorliegen.

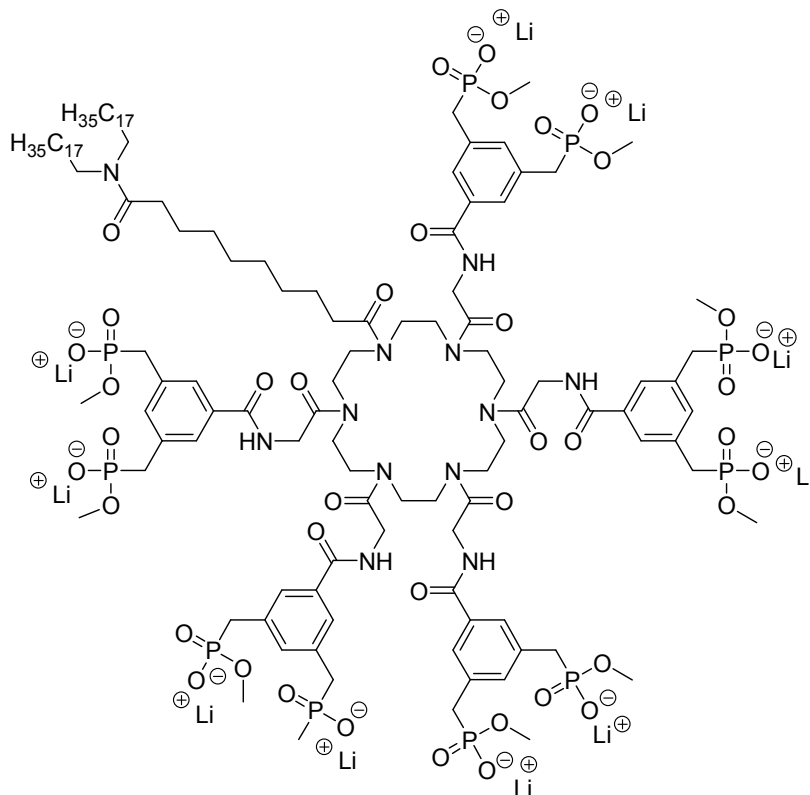
Der in dieser Arbeit synthetisierte Rezeptor **11** zeigt schon gute Immobilisierungsmöglichkeiten auf lipidischen Oberflächen. Insbesondere für rekombinante Proteine mit Decaarginin-Tag wurde eine beträchtliche Menge an irreversibler Bindung auf der Oberfläche erreicht. Ob damit schon ein Protein-Protein-Crosstalk auf Oberflächen beobachtet werden kann, indem zwei verschiedene Proteine, die untereinander wechselwirken können, auf einer Oberfläche immobilisiert werden, bleibt unbedingt zu probieren. Eine zu einem gewissen Teil irreversible Immobilisierung von Arg-getagkten Proteinen in bioaktiver Form ist mit dem Rezeptorlipid **11** auf jeden Fall möglich. Ob dieser Anteil allerdings für die Beobachtung eines Protein-Protein-Crosstalks ausreicht, bleibt zu untersuchen. Außerdem müssen dafür noch zwei geeignete Proteine gefunden werden, von denen sich zumindest eins gut rekombinant mit einem Arg-Tag überexprimieren lässt.

Um eine komplette Immobilisierung von Proteinen erreichen zu können, muss die Leistungsfähigkeit des Rezeptors noch weiter verbessert werden. Eine Möglichkeit besteht darin, den Rezeptor mit einem längeren Spacer zwischen Cyclamgerüst und

dem Lipidanker zu synthetisieren, damit der Makrocyclus weiter aus der Lipidoberfläche herausragt und so wahrscheinlich noch effektiver wäre. So würde sich anbieten nicht einen Bernsteinsäure-Spacer zu verwenden, sondern einen Dodecandisäurespacer.

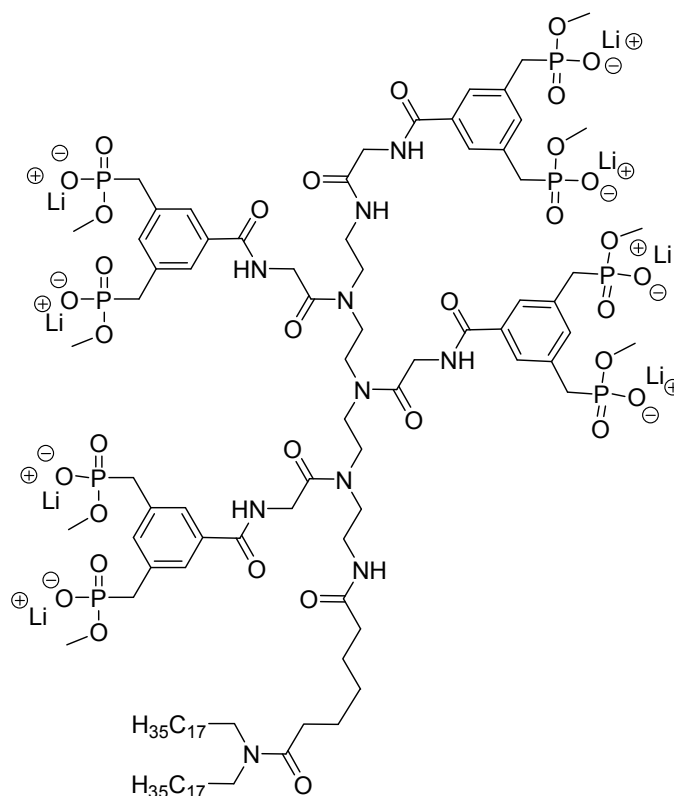
Um die Fluoreszenztitrationsen noch aussagekräftiger zu machen, und größere Veränderungen in der Absorption zu erhalten, müsste vermutlich das Dansyl-Label nicht direkt an das Stickstoffatom des Cyclam gekuppelt werden, sondern über einen Spacer von acht bis zehn  $\text{CH}_2$ -Gruppen, um größere Effekte zu erhalten und den Fehler bei den Titrationsen zu verringern.

Desweiteren kann der Weg über die Multivalenzen weiter verfolgt werden. Eine Möglichkeit in der Optimierung des Rezeptorlipids **11** besteht darin, einen größeren Makrocyclus zu wählen und so nicht nur drei BP an das Gerüst zu befestigen, sondern vier oder sogar fünf BP-Bindungseinheiten.





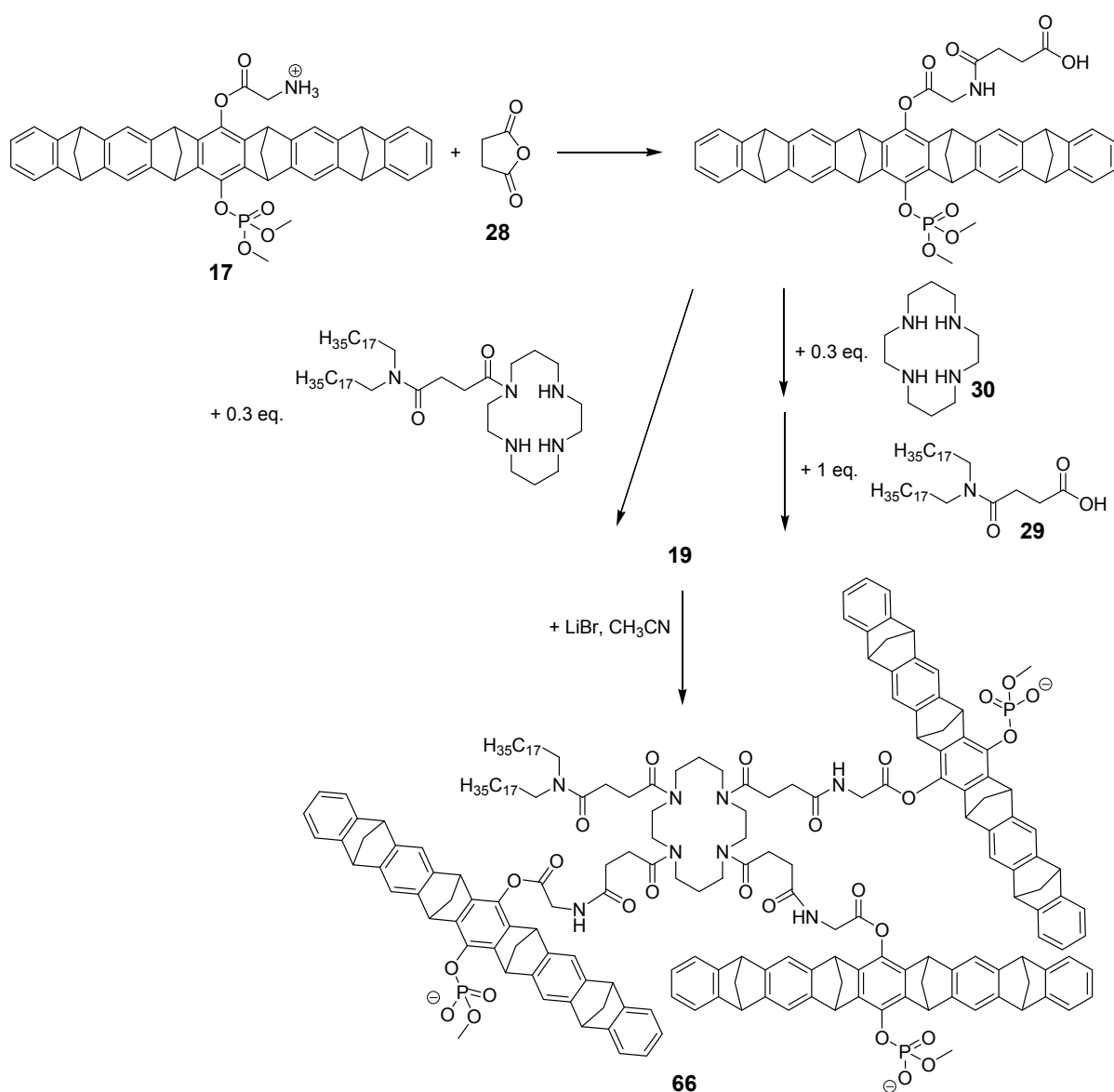
Alternativ könnte ein noch flexiblerer Rezeptor in linearer Form zeigen, welche Eigenschaften eines Rezeptors auf der Oberfläche von Vorteil sind, eher die cyclischen Formen, oder eher die sehr flexible, lineare Form.



Ein weiterer Ansatzpunkt besteht darin, das Prinzip der Multivalenzen in Form von Polymeren aus den in dieser Arbeit synthetisierten Monomeren fortzuführen. In dieser Arbeit wurden nur statistische, radikalische Polymerisationen mit AIBN als Radikalstarter getestet. Da so keine Polymerisation erreicht wurde, bliebe zu versuchen, ob eine Polymerisation über ionische Polymerisationen (z.B. lebende anionische Polymerisation) erfolgreich verläuft. Eine weitere Möglichkeit dazu bieten die über Radikale verlaufende ATRP-Polymerisation (Atom Transfer Radikal Polymerization) oder die RAFT-Polymerisation (Reversible Addition Fragmentation Chain Transfer).

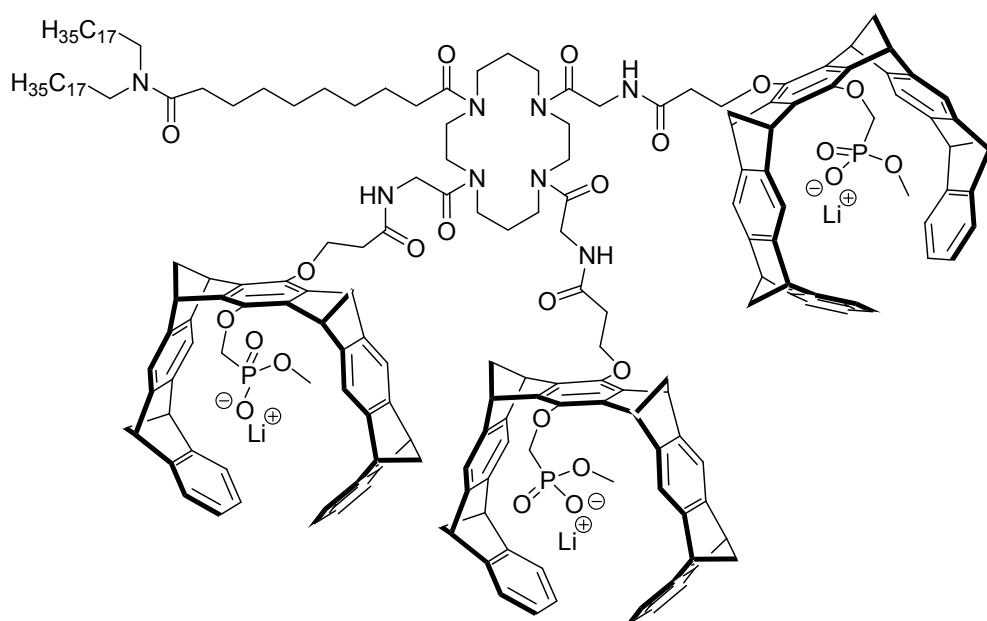
Der auch schon in dieser Arbeit verfolgte Ansatz, die von *F.-G. Klärner* und *T. Schrader* entwickelten Benzen-Pinzetten unsymmetrisch zu substituieren und diese an das Cyclam-Gerüst zu kuppeln, scheint der ideale Weg um das Cyclam-

basierte System beibehalten zu können und auf diese Weise eine Optimierung des Rezeptorlipids zu erhalten. Bei der versuchten Synthese des Moleküls **19**, lag die Schwierigkeit in der Kupplung der Phosphat-Glycin-Pinzette **17** an die Cyclam-Tricarbonsäure **18**. Vermutlich gehen diese Schwierigkeiten dabei von der Löslichkeit der Tricarbonsäure **18** aus. Ein Weg, der zum Erhalt des Rezeptors **19** führen könnte, ist die Funktionalisierung der Pinzette mit einer Carbonsäure, die dann an das Cyclamgerüst **30** gekuppelt wird. Dabei sind zwei Wege möglich. Zum einen wird zuerst das Cyclamgerüst mit dem Lipidanker funktionalisiert und anschließend mit drei Pinzetten umgesetzt, oder aber analog der Synthese des Rezeptorlipids **11**, zuerst mit drei Pinzetten verknüpft und der Lipidanker anschließend an das freie sekundäre Amin gekuppelt (Abbildung 88).



**Abbildung 88:** Möglicher neuer Syntheseweg zum Rezeptor **66**

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, die Esterfunktionen des Hydrochinons durch inerte Etherfunktionen zu ersetzen. Mit diesen ersten Schritten wurde bereits in unserer Gruppe begonnen. Um die labile Phosphorsäureesterbindung zu ersetzen, wäre es ideal, einen Methylenspacer zwischen Phosphonat und Hydrochinon einzufügen. Inwieweit darunter die Lysinbindefähigkeit leiden könnte, bleibt dabei zunächst offen. Auf diese Weise würden die beiden Schwachstellen der Pinzetten eliminiert werden. Ob damit eine Kupplung an das Cyclamgerüst erfolgreich verlaufen kann, bleibt weiterhin auszuprobieren.



## 5. Experimenteller Teil

### 5.1. Materialien

#### Chemikalien und Geräte

Die in der Synthese eingesetzten Chemikalien wurden über die Firmen *Sigma-Aldrich Chemical* (München), *Bachem* (Bubendorf, Schweiz), *Fluka* (Taufkirchen), *Acros Organics* (Geel, Belgien), *Lancaster Synthesis* (Frankfurt a. M.) und von *Merck4Biosciences* (*Novabiochem*, *Calbiochem*) (Darmstadt) in den Qualitäten *purris.*, *purrum* oder *p.a.* erworben.

Das zur Liposomenpräparation verwendete 1-Stearoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidycholin (SOPC) wurde über *Avanti Polar Lipids, Inc.* (Alabaster, USA) bezogen.

Für die DNA-dotierten Liposomen wurde 3'-Cholesterol-markierte 30 Basenpaar DNA mit der Basensequenz 5'-AGC TGC AGC TGC GTG ACG AAC CTC GCA GCT [Chol]-3' benötigt, die ebenso wie der komplementäre DNA-Strang mit der Basensequenz 5'-AGC TGC GAG GTT CGT CAC GCA GCT GCA GCT-3' von der Firma *Metabion international AG* (Martinsried) bezogen wurde.

#### Lösungsmittel

Die verwendeten Lösungsmittel wurden über die Firmen *Fluka* (Taufkirchen), *Acros Organics* (Geel, Belgien) und *Sigma-Aldrich Chemical* (München) in der Qualität *purris.* und *anhydrous* erworben und über Molsieb gelagert oder vor Gebrauch destilliert und bei Bedarf nach Standardmethoden absolutiert.<sup>[236, 237]</sup>

Die für die NMR-Spektroskopie verwendeten Lösungsmittel wurden über die Firma *Aldrich Chemical Co.* (München) bezogen und über Molsieb gelagert.

Das eingesetzte Wasser war entionisiert und wurde im Bedarfsfall nochmals über eine Purelab UHQ Anlage der Firma *ELGA Berkefeld* (Celle) entionisiert (Bdest-Wasser).

## Chromatographie

Bei der Dünnschichtchromatographie kamen *Alugram SIL G/UV<sub>254</sub>* bzw. *Polygram SIL G/UV<sub>254</sub>* Kieselgelplatten mit Fluoreszenzindikator der Firma *Roth* (Karlsruhe) zum Einsatz. Zur Detektion wurde UV-Licht der Wellenlängen  $\lambda = 254 \text{ nm}$  und  $366 \text{ nm}$  verwendet. Alternativ wurden die Dünnschichtchromatogramme mit Ninhydrin-Lösung oder CAM-Lösung behandelt und anschließend im Heißluftstrom entwickelt oder in einer Iodkammer mit elementarem Iod oxidiert.

Die präparative Säulenchromatographie wurde mit Kieselgel 60 der Firma *Fluka* (Taufkirchen) durchgeführt. Die verwendeten Laufmittelgemische und die erhaltenen  $R_f$ -Werte sind im Syntheseteil 5.3. bei den entsprechenden Synthesevorschriften vermerkt.

### Ninhydrin-Reagenz:

0.15 g (0.84 mmol) Ninhydrin, gelöst in 47.5 mL Isopropanol und 2.5 mL Essigsäure

### CAM-Lösung:

15.0 g Ammoniummolybdat, 1.0 g Cersulfat, gelöst in 200 mL Wasser und 25 mL konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$

## Verwendeter Puffer

### HEPES-Puffer mit NaCl:

Als Standard-Puffer wurde 20 mM HEPES-Puffer mit einer NaCl Konzentration von 150 mM eingesetzt. Dazu wurden 4.77 g HEPES und 8.77 g NaCl in 1 L Bidest.-Wasser gelöst und mit konzentrierter wässriger NaOH auf einen pH-Wert von 7.5 bei  $25^\circ\text{C}$  eingestellt. Für die Filmwaagemessungen wurde der gleiche Puffer benutzt, lediglich ohne Zusatz von NaCl.

## **Reinigungsmaterialien:**

### Piranha-Säure:

Zur Reinigung der Glasträger für die RfS-Messungen wurde konzentrierte Piranha-Säure eingesetzt. Dazu wurden 2 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30 %) in einem Becherglas vorgelegt und vorsichtig mit 4 mL konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  versetzt.

### Labortücher Kimtech Science

Zur manuellen Reinigung der Oberfläche der Glasträger wurden Papiertücher der Firma *Kimberly-Clark Professional* (Koblenz) benutzt.

## **Ultraschallstab**

Zur Darstellung der Liposomen wurde der analoge Ultraschallstab Sonifier S-250A der Firma *Branson, EMERSON Technologies GmbH & Co.OHG* (Dietzenbach) mit 250 Watt eingesetzt.

## **Thermomixer**

Zur Hybridisierung der DNA-Einzelstränge wurde der Thermomixer compact der Firma *Eppendorf AG* (Hamburg) benutzt.

## **Bidest. Anlage**

Bidestilliertes Wasser wurde aus dest. Wasser der Hausanlage gewonnen, indem die Reinigungsanlage Pureab UHY der Firma *ELGA Berkefeld* (Celle) eingesetzt wurde. Der Reinheitsgrad des bidest. Wassers liegt bei  $> 18 \text{ M}\Omega\text{cm}$ .

## **Sonstige Materialien**

- V156-MicroWell-Platten mit konischer Vertiefung (mit einem Volumen für max. 250  $\mu\text{L}$ /Well) der Firma *Thermo Fisher Scientific, Nunc GmbH & Co. KG* (Langenselbold), für den RfS-Autosampler (BIASampler).
- Eppendorf Zentrifuge MiniSpin der Firma *Eppendorf AG* (Hamburg)
- Extruder *LiposoFast Basic* mit Stabilisator der Firma *Avestin* (Mannheim) mit 200 nm Polycarbonatmembranen
- pH-Meter inoLab pH Level1 der Firma *WTW GmbH* (Weilheim)

## 5.2. Methoden

### Kernresonanz-Spektroskopie

Die Kernresonanzspektren wurden mit folgenden Geräten gemessen:

Advance Spektrometer DRX-500 ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$ , DEPT 90, DEPT 135, COSY 90, HSQC, HMBC) der Firma *Bruker* (Bremen).

Advance Spektrometer DMX-300 ( $^1\text{H}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,) der Firma *Bruker* (Bremen).

In den  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren beziehen sich die angegebenen chemischen Verschiebungen  $\delta$  auf das Restprotonensignal des verwendeten deuterierten Lösungsmittels. In den  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren wurde auf das  $^{13}\text{C}$ -Signal des verwendeten Lösungsmittels kalibriert. Die Angabe der chemischen Verschiebung  $\delta$  erfolgt in parts per million (ppm). Die eingesetzten deuterierten Lösungsmittel sind in den jeweiligen Spektren vermerkt. Alle  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren wurden Breitband-entkoppelt gemessen.

Die Kopplungskonstanten  $J$  sind in Hertz (Hz) angegeben. Die Beschreibung der Spinmultiplizitäten erfolgt folgendermaßen: s = Singulett, d = Dublett, dd = Dublett von Dublett, m = Multiplett, t = Triplett, dt = Dublett vom Triplett, q = Quartett, qt = Quintett, bs = breites Singulett. Zusätzlich zur Multiplizität ist die integrierte Protonenzahl angegeben. Die genauere Zuordnung der Signale wurde, falls notwendig, mit Hilfe von 2D-NMR-Experimenten vorgenommen.

### Massenspektroskopie

Die hochaufgelösten Massenspektren wurden mit einem Bio TOF III der Firma *Bruker GmbH* (Bremen) gemessen. Die Messmethode ist im jeweiligen Analytikteil neben dem Lösungsmittel in Klammern angegeben. Angegeben sind des Weiteren jeweils die  $m/z$ -Werte der wichtigsten Signale. Zusätzlich sind die Summenformel, die berechnete und die gefundene Masse angegeben.

### **Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIfS)**

Die optischen Messungen zur Untersuchung der bimolekularen Interaktionseigenschaften zwischen in dieser Arbeit synthetisierten Rezeptoren und Proteinen, wurden mittels des Spektrometers *BIAffinity* und dem zugehörigen Probenwechsler (*BIASampler*) der Firma *AnalytikJena AG* (Jena) durchgeführt. Die Messungen erfolgten, wie im entsprechenden Teil, Kapitel 5.5, beschrieben.

### **Filmwaage**

Zur Messung auf Lipidmonoschichten (Stearinsäure) an der Luft-Wasser Grenzphase wurde die Filmwaage 601BAM (Oberflächengröße: 700 x 100 mm<sup>2</sup>) der Firma *NIMA Technology Ltd.* (Coventry, UK) eingesetzt.

### **UV-vis-Spektroskopie**

Für die Messungen der DNA-Schmelzkurven wurde das Gerät FP-6500-Spektrometer der Firma *Jasco* (Gross-Umstadt) verwendet.

### **Fluoreszenz-Spektroskopie**

Für Fluoreszenzmessungen wurde das Gerät FP-6500-Spektrometer der Firma *Jasco* (Gross-Umstadt) benutzt.

### **Schmelzpunkte**

Die Schmelzpunkte wurden mit dem Messgerät Melting Point B-540 der Firma *Büchi* (Essen) gemessen und sind nicht korrigiert.

### **Probenvorbereitung**

Für die Gefriertrocknung der Liposomenfilme und wasserhaltiger Proben wurde die Gefriertrocknungseinheit Alpha 2-4 LSC der Firma *Christ* (Osterode) verwendet.



**RfS-Glasträger (Glastransducer)**

Die RfS-Messungen wurden auf hydrophilen Glasträgern mit einem Interferenzschichtsystem, bestehend aus 10 nm Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> und 330 nm SiO<sub>2</sub>, auf D 263 Glassubstrat der Firma *Schott* (Mainz) durchgeführt. Vor den Messungen wurden die Glasträger gereinigt, indem sie mit Aceton gewaschen und anschließend mit den Labortüchern *Kimtech Science* mechanisch gereinigt wurden. Die so vorgereinigten Glasträger wurden für 30 min. in frisch zubereiteter Piranha-Säure gekocht, um die Oberfläche mit Silanolgruppen anzureichern. Abschließend wurden die Transducer gründlich mit viel bidest. Wasser gespült und im Argonstrom getrocknet, bevor sie direkt in die entsprechenden Halterungen eingelegt wurden und ins Spektrometer eingesetzt werden konnten.

**Liposomenpräparation für reine SOPC-Vesikel**

Die Stammlösung des SOPC (25 mg SOPC gelöst in 2.5 mL CHCl<sub>3</sub>) entsprach einer Stoffmengenkonzentration von  $c = 12.7 \text{ mmol/L}$  oder 10 mg/mL. Die Gesamtlipidkonzentration in der Vesikellösung sollte 250  $\mu\text{M}$  Lipid entsprechen. Dazu wurden 197  $\mu\text{L}$  der SOPC-Stammlösung in einen 25 mL Kolben pipettiert und das Chloroform am Rotationsverdampfer abdestilliert. Der so erhaltene Lipidfilm wurde über Nacht gefriergetrocknet und dann mit 10 mL HEPES-Puffer (20 mM, 150 mM NaCl, pH = 7.5) wieder aufgenommen. Durch ständiges Schwenken der Lösung bildete sich eine weißliche trübe Lösung, die in ein 50 mL Becherglas umgefüllt wurde und unter Eiskühlung dreimal für jeweils 10 min. mit Ultraschall behandelt wurde, um eine klare Liposomenlösung zu erhalten. Um noch enthaltene Feststoffe (z.B.: Metallstaub/Titan von der Ultraschallbehandlung) zu entfernen, wurde die Lösung in Eppendorfgefäße umgefüllt und 15 min. bei 10000 Umdreh./min mit einer Eppendorffzentrifuge zentrifugiert. Die Liposomen wurden in ein Falcontube umgefüllt und dort bei RT aufbewahrt und sind mindestens 3 Monate haltbar.

**Liposomenpräparation für Rezeptorlipid 11 / SOPC – Vesikel (10:90)**

Für eine 1.75 mM Stammlösung des Rezeptorlipids **11** wurden 9.11 mg des Cyclambasierten Rezeptors **11** eingewogen und in einem Gesamtvolumen von 2.53 mL Lösungsmittelgemisch bestehend aus 600  $\mu\text{L}$  MeOH pa. und 1930  $\mu\text{L}$  CHCl<sub>3</sub> pa. gelöst. Die Liposomen sollten einen Dotierungsgrad des Rezeptors von 10 %

aufweisen, bezogen auf eine Gesamtlipidkonzentration von 250  $\mu\text{M}$  (25  $\mu\text{M}$  **11**, 225  $\mu\text{M}$  SOPC). Dazu wurden, um später 10 mL Liposomenlösung zu erhalten, 142.9  $\mu\text{L}$  der Rezeptorstammlösung **11** und 177.3  $\mu\text{L}$  der SOPC-Stammlösung in einen 25 mL Kolben pipettiert, vermischt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert. Der so erhaltene Lipidfilm wurde über Nacht gefriergetrocknet und anschließend mit 10 mL HEPES-Puffer (20 mM, 150 mM NaCl, pH = 7.5) wieder aufgenommen und so lange geschwenkt, bis sich der Lipidfilm wieder löste und eine weißlich trübe Mischung entstand. Diese Mischung wurde in ein 50 mL Becherglas überführt und mit dem Ultraschallstab im Eisbad dreimal für jeweils 10 min. mit Ultraschall behandelt, um eine klare Liposomenlösung zu erhalten. Die Mischung wurde in Eppendorfgefäße umgefüllt und in einer Eppendorfschleuse bei 10000 Umdreh./min für 15 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde in Falcontubs gefüllt und bei RT aufbewahrt.

### **Liposomenpräparation für DNA – Vesikel (10:90)**

Von der 50  $\mu\text{M}$  ds-DNA (in bidest. Wasser) wurden 500  $\mu\text{L}$  in einen 10 mL Kolben pipettiert, mit 100  $\mu\text{L}$  Methanol versetzt und 17.7  $\mu\text{L}$  der SOPC Stammlösung hinzugefügt, um später 1 mL der DNA-Liposomenlösung mit einer Gesamtlipidkonzentration von 250  $\mu\text{M}$  (25  $\mu\text{M}$  ds-DNA und 225  $\mu\text{M}$  SOPC) zu erhalten. Die Dotierung mit Cholesterol-modifizierter ds-DNA beträgt dann in den Liposomen 10 %. Das Lösungsmittel wurde zuerst am Rotationsverdampfer abdestilliert und der so erhaltene Lipidfilm anschließend über Nacht gefriergetrocknet, mit 1 mL HEPES-Puffer wieder aufgenommen und so lange geschwenkt, bis der Film vollständig in Lösung ging und eine milchig trübe Mischung erhalten wurde. Zur Herstellung einer Liposomenlösung wurde die Extrusionmethode angewendet, wozu der Extruder *LiposoFast Basic* mit Stabilisator der Firma *Avestin* (Mannheim) mit 200 nm Polycarbonatmembranen verwendet wurde. Ein Milliliter der trüben Mischung wurde in den Extruder gegeben und 19 mal durch die Membran gepresst. Anschließend lag eine schaumige Liposomenmischung vor, die in ein Eppendorfgefäß gefüllt wurde und bei RT am Rotationsverdampfer bei 70 mbar für 30 min. entgast wurde. Die so erhaltene Vesikelmischung wurde im Kühlschrank bei 4 °C gelagert und ist eine Woche haltbar.

**Hybridisierung der DNA-Einzelstränge**

Die beiden Lösungen der DNA-Einzelstränge (in bidest. Wasser), der 3'-Cholesterol markierte 30 Basenpaar-DNA-Einzelstrang und der komplementäre DNA-Einzelstrang ohne Cholesterolanker, wurden so zusammen pipettiert, dass jeweils eine 100  $\mu\text{M}$  Konzentration von beiden Einzelsträngen im Eppendorfgefäß vorlag. Die wässrige Lösung wurde im Thermomixer für 5 min. auf 90 °C erhitzt und sehr langsam und erschütterungsfrei bis auf RT abgekühlt und über Nacht stehen gelassen. Auf diese Weise wurde eine 50  $\mu\text{M}$  Lösung der ds-DNA in Bidest. Wasser erhalten.

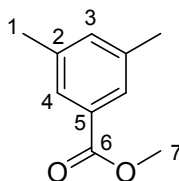
**ds-DNA Schmelzkurve**

20  $\mu\text{L}$  der ds-DNA wurden zu 480  $\mu\text{L}$  bidest. Wasser gegeben, um eine 2  $\mu\text{M}$  ds-DNA-Lösung zu erhalten. Davon wurden 450  $\mu\text{L}$  in eine UV-Küvette gegeben und im UV-Spektrometer unter Rühren innerhalb von 30 min. von 20 °C auf 80 °C erwärmt und dabei in regelmäßigen Abständen die UV-Absorption bei 260 nm gemessen. Es wurde eine sigmoidale Kurve erhalten, deren Wendepunkt dem Schmelzpunkt der DNA entspricht.

## 5.3. Synthesen

### 5.3.1. Synthese des Benzoessäure-Bisphosphonat-Rezeptors **24**

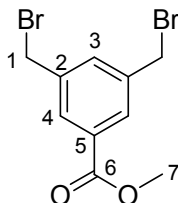
#### 5.3.1.1. 3,5-Dimethylbenzoessäuremethylester **21**



#### Durchführung:

10.0 g (66.6 mmol) 3,5-Dimethylbenzoessäure **20** werden in 400 mL Methanol gelöst, mit 15 mL konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  versetzt und 8 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen wird das Lösungsmittel abdestilliert. Der verbleibende ölige Rückstand wird mit 200 mL Dichlormethan aufgenommen und die organische Phase mit 100 mL Wasser, 100 mL ges.  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung und zweimal mit je 50 mL Wasser gewaschen. Die organische Phase wird über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Es werden 9.37 g (53.1 mmol) des Produkts **21** als weißer Feststoff erhalten.

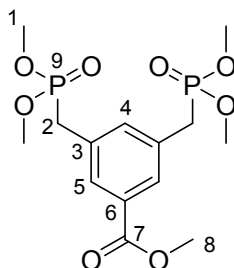
**Ausbeute:** 86 %; **Schmp.:** 36 °C;  **$^1\text{H-NMR}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  [ppm] = 2.43 (s, 6H, H-1); 3.97 (s, 3H, H-7); 7.35 (s, 1H, H-3); 7.74 (s, 2H, H-4).

**5.3.1.2. 3,5-Bis(bromomethyl)benzoesäuremethylester **22**<sup>[65]</sup>****Durchführung:**

6.0 g (36.5 mmol, 1.0 eq.) 3,5-Dimethylbenzoesäuremethylester **21** und 13.0 g (73.0 mmol, 2.0 eq.) NBS werden in 250 mL abs. Ameisensäuremethylester gelöst und zum Sieden erhitzt. Dann wird eine katalytische Menge AIBN zugegeben und die Reaktionsmischung 7 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen der Mischung auf RT wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer abdestilliert und der Rückstand mit 200 mL Cyclohexan aufgenommen. Das sich abscheidende Succinimid wird abfiltriert und dieser Vorgang viermal wiederholt. Das Lösungsmittel wird abdestilliert und das Rohprodukt ohne weitere Aufarbeitung weiter verwendet. Es werden 9.5 g Rohprodukt erhalten. Bezogen auf das entsprechende Produkt **22** entspricht das 29.6 mmol.

**Ausbeute:** 81 % Rohprodukt; **Schmp.:** 170 °C; **<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz):  $\delta$  [ppm] = 3.75 (s, 3H, H-7); 4.37 (s, 4H, H-1); 6.82 (s, 2H, H-4); 6.93 (s, 2H, H-3).

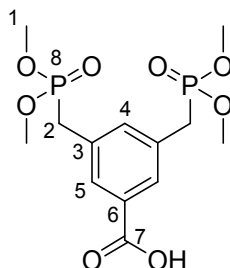
### 5.3.1.3. 3,5-Bis(dimethoxyphosphorylmethyl)benzoesäuremethylester **23**<sup>[65, 238]</sup>



#### **Durchführung:**

9.0 g (28.0 mmol, 1.0 eq.) des nicht aufgereinigten 3,5-Bis(brommethyl)benzoesäuremethylesters **22** werden mit 8.7 g (70.0 mmol, 8.3 mL, 2.5 eq.) Trimethylphosphit 3 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf RT wird überschüssiges Trimethylphosphit im Vakuum durch Umkondensation abdestilliert. Das erhaltene ölige Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie über Kieselgel (KG 60, EA/MeOH 10:1) aufgereinigt. Es werden 7.67 g (20.2 mmol) des Produkts **23** als weißer Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 72 %; **R<sub>f</sub>** = 0.23 (EA/MeOH 10:1); **Schmp.:** 110 °C; **<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz):  $\delta$  [ppm] = 3.16 (d,  $^2J_{\text{H,P}}$  = 22.3 Hz, 4H, H-2); 3.66 (d,  $^3J_{\text{H,P}}$  = 10.8 Hz, 12H, H-1); 3.87 (s, 3H, H-8); 7.42 (s, 1H, H-4); 7.82 (s, 2H, H-5). **<sup>31</sup>P-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 120 MHz):  $\delta$  [ppm] = 28.5 (P-9).

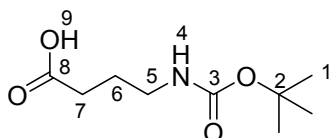
**5.3.1.4. 3,5-Bis(dimethoxyphosphorylmethyl)benzoesäure **24****<sup>[65, 238]</sup>**Durchführung:**

1.0 g (2.63 mmol, 1.0 eq.) 3,5-Bis(dimethoxyphosphorylmethyl)benzoesäuremethylester **23** wird in 30 mL MeOH/Wasser (2:1) gelöst, auf  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  gekühlt und mit 95 mg (3.95 mmol, 1.5 eq.) Lithiumhydroxid versetzt. Die Lösung wird bei  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 6 h gerührt und weitere 8 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird mit 10 mL verdünnter Salzsäure (1:1) aufgenommen und mit jeweils 50 mL Dichlormethan fünfmal ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen werden über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer abdestilliert. Es werden 0.86 g (2.34 mmol) an **24** als weißer Feststoff gewonnen.

**Ausbeute:** 89 %; **Schmp.:**  $156\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  **$^1\text{H-NMR}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  [ppm] = 3.27 (d,  $^2J_{\text{H,P}} = 21.3\text{ Hz}$ , 4H, H-2); 3.71 (d,  $^3J_{\text{H,P}} = 10.5\text{ Hz}$ , 12H, H-1); 7.42 (s, 1H, H-4); 7.84 (s, 2H, H-5).  **$^{31}\text{P-NMR}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 120 MHz):  $\delta$  [ppm] = 28.3 (P-8).

### 5.3.2. Synthese des Cyclam-basierten BP-Rezeptors mit Lipidanker 11

#### 5.3.2.1. 4-(*tert.*-Butoxycarbonylamino)butansäure (GABA-Boc) **26**<sup>[172]</sup>

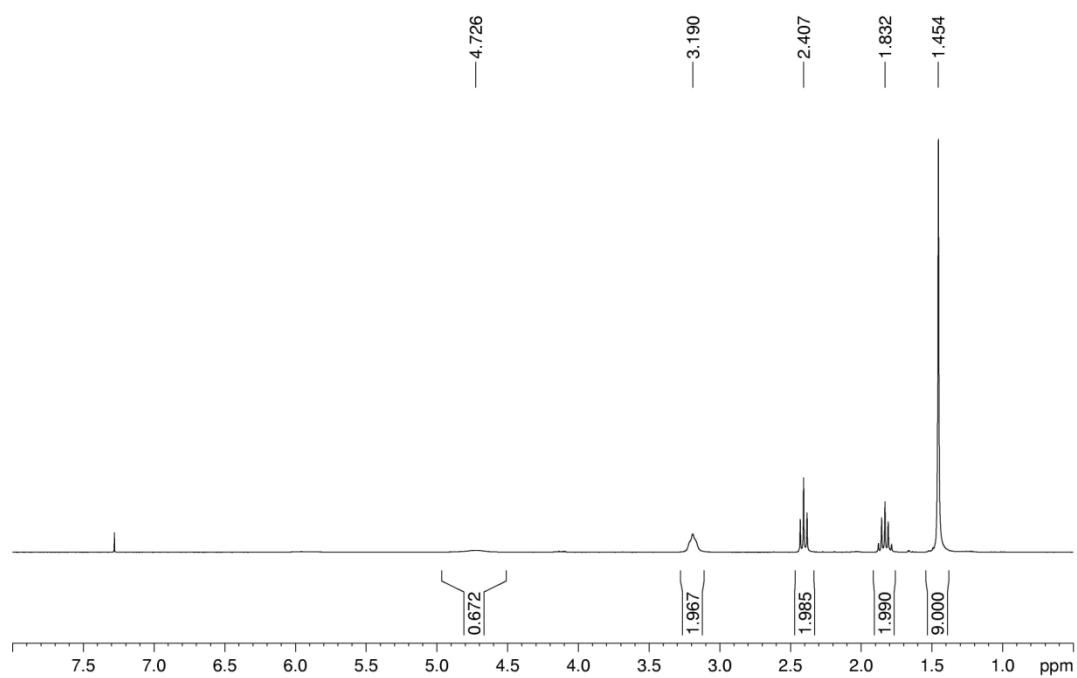


#### Durchführung:

2.06 g (20.0 mmol, 1.0 eq.) 4-Aminobutansäure (GABA) **25** werden in einer Mischung aus 40 mL 1,4-Dioxan, 20 mL Wasser und 20 mL 1 M NaOH gelöst und im Eisbad auf 0 °C gekühlt. Zu der Lösung werden 4.80 g (22.0 mmol, 1.1 eq.) Di-*tert.*-butyldicarbonat gegeben und die Reaktionsmischung 1 h bei 0 °C und 16 h bei RT gerührt. Die Lösung wird im Vakuum auf die Hälfte des ursprünglichen Volumens eingeeengt und im Eisbad auf 0 °C gekühlt, mit 40 mL Ethylacetat überschichtet und unter starkem Rühren mit einer konzentrierten wässrigen Lösung von KHSO<sub>4</sub> auf einen pH = 2-3 angesäuert. Die organische Phase wird schnell abgetrennt und die wässrige Phase dreimal mit je 50 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit 50 mL ges. NaCl-Lösung gewaschen und über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer abdestilliert, wobei ein farbloses Öl erhalten wird, welches über Nacht im Eisfach auskristallisiert. Es werden 3.90 g (19.2 mmol) **26** als weißer Feststoff erhalten.

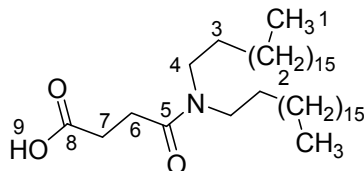
**Ausbeute:** 96 %; **Schmp.:** 53 °C; **<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz):  $\delta$  [ppm] = 1.45 (s, 9H, H-1); 1.83 (qt., <sup>3</sup>J = 6.8 Hz, 2H, H-6); 2.41 (t, <sup>3</sup>J = 6.8 Hz, 2H, H-5); 3.19 (m, 2H, H-7); 4.73 (m, 1H, H-4). **<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 75.4 MHz):  $\delta$  [ppm] = 25.23 (C-6); 28.50 (C-1); 31.40 (C-7); 40.02 (C-5); 79.62 (C-2); 156.37 (C-3); 178.43 (C-8). **HRMS** (ESI pos., MeOH): ber. für C<sub>9</sub>H<sub>17</sub>NNaO<sub>4</sub> [M+Na]<sup>+</sup> m/z: 226.1050, gef.: m/z: 226.1048.





**Abbildung 89:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) von **26**.

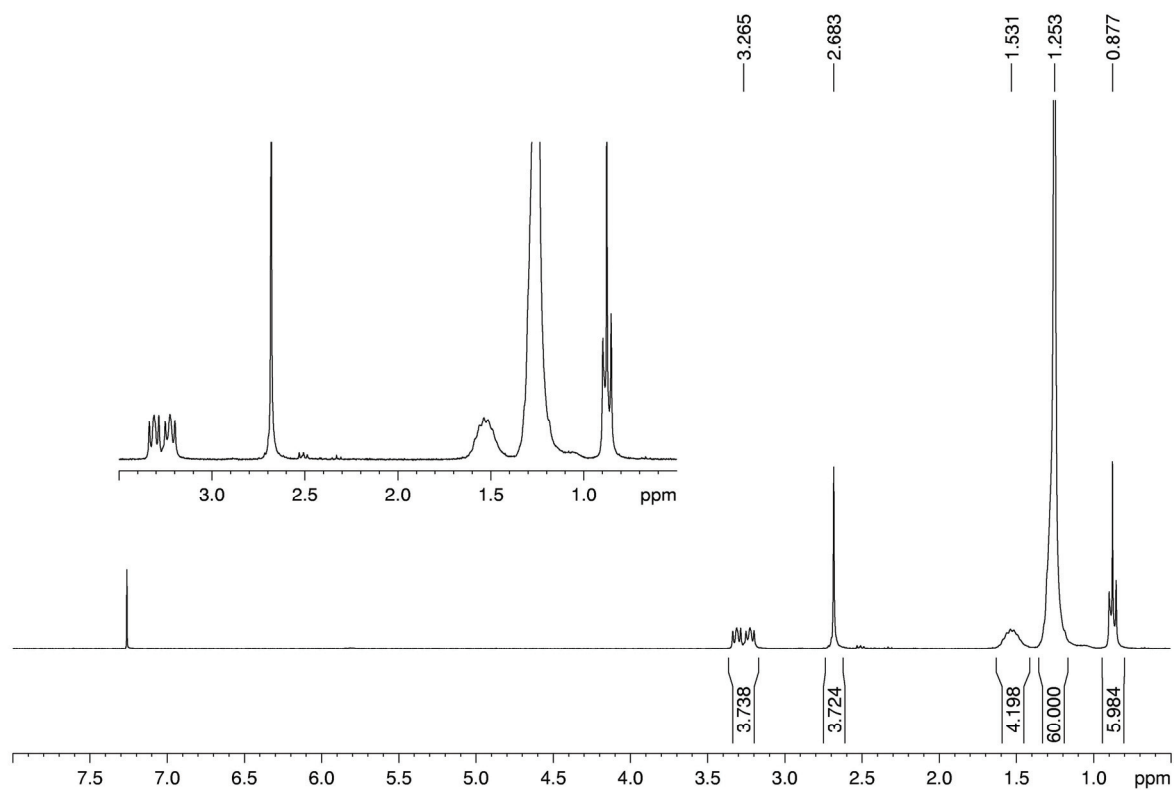
### 5.3.2.2. *N,N*-Diocetadecylamino-*N*-oxobutansäure (DODA-Suc) **29**<sup>[72]</sup>



#### Durchführung:

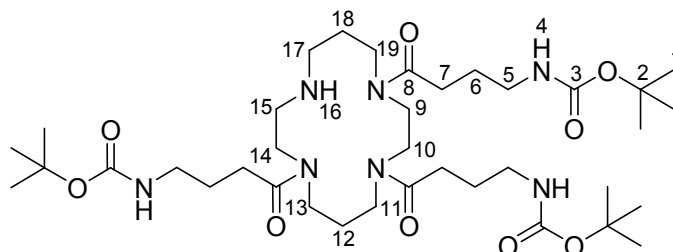
1.50 g (2.87 mmol, 1.0 eq.) *N,N*-Diocetadecylamin **27** und 0.57 g (5.75 mmol, 2.0 eq.) Bernsteinsäureanhydrid **28** werden in 50 mL abs.  $\text{CHCl}_3$  gelöst und 5 min. bei RT gerührt. Nach Zugabe von 2.61 g (25.83 mmol, 3.6 mL, 9.0 eq.)  $\text{NEt}_3$  wird die Reaktionsmischung weitere 24 h bei RT unter Argon gerührt. Die organische Phase wird zweimal mit je 40 mL 1 M HCl und anschließend dreimal mit je 40 mL Wasser gewaschen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer abdestilliert. Es werden 1.68 g (2.70 mmol) des Produkts **29** als weißer Feststoff isoliert.

**Ausbeute:** 94 %; **Schmp.:** 67 °C;  **$^1\text{H-NMR}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  [ppm] = 0.88 (t, 6H, H-1); 1.25 (m, 60H, H-2); 1.53 (m, 4H, H-3); 2.68 (m, 4H, H-6, H-7); 3.27 (dt, 4H, H-4).  **$^{13}\text{C-NMR}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 75.4 MHz):  $\delta$  [ppm] = 14.11 (C-1); 14.53-30.42 (C-2); 33.2 (C-6); 33.8 (C-7); 47.56 (C-3); 48.92 (C-4); 172.85 (C-5); 177.01 (C-8). **HRMS** (ESI pos., MeOH): ber. für  $\text{C}_{40}\text{H}_{80}\text{NO}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  m/z: 622.6138, gef.: m/z: 622.6132; ber. für  $\text{C}_{40}\text{H}_{79}\text{NNaO}_3$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  m/z: 644.5958, gef.: m/z: 644.5962.



**Abbildung 90:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) von **29**.

**5.3.2.3. {4-[4,8-Bis-(4-*tert*-butoxycarbonylamino-butyl)-1,4,8,11-tetraazacyclotetradec-1-yl]-4-oxobutyl}-carbaminsäure-*tert*-butylester **31****<sup>[34, 77]</sup>

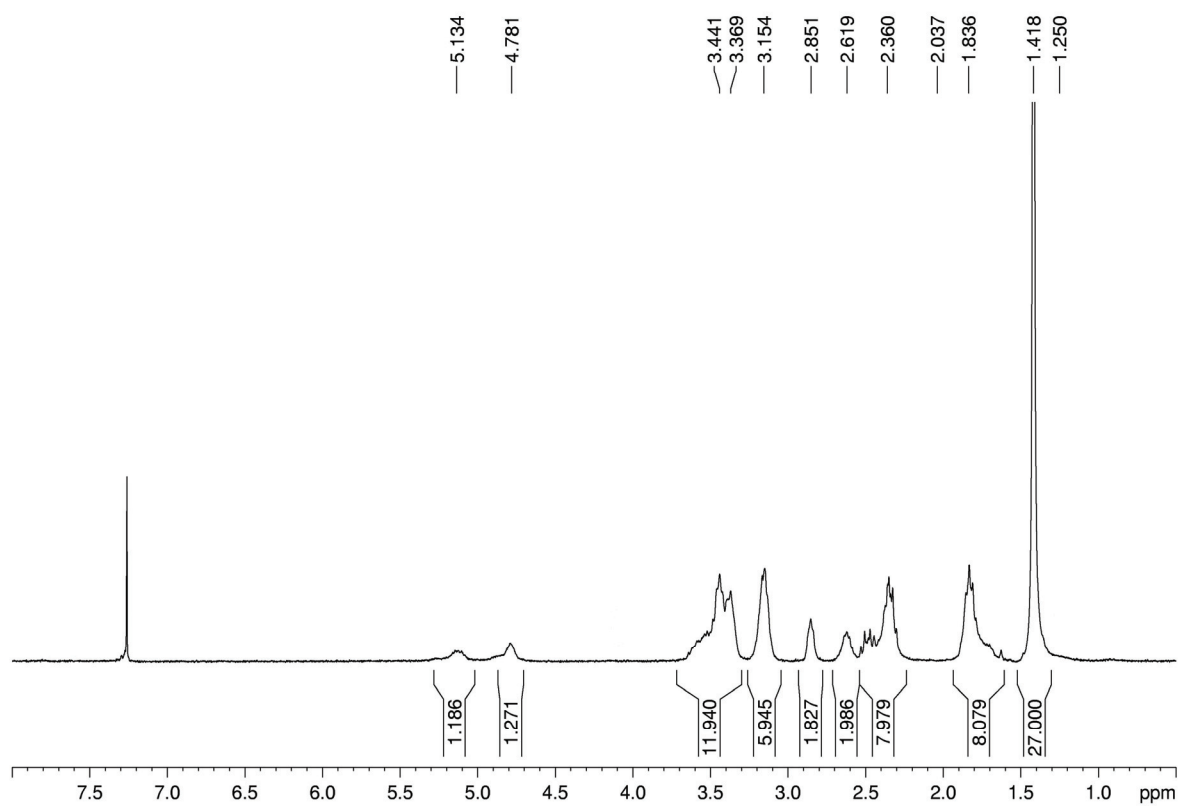


**Durchführung:**

406 mg (2.00 mmol, 3.03 eq.) 4-(*tert*-Butoxycarbonylamino)-butansäure **26** werden in 60 mL abs. DCM unter Argon gelöst und anschließend mit 452 mg (3.50 mmol, 610  $\mu$ L, 5.30 eq.) EDIPA versetzt. Nach wenigen Minuten Rühren bei RT werden 134 mg (0.66 mmol, 1.00 eq.) Cyclam **30** zur Reaktionsmischung gegeben und weitere 16 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer bei vermindertem Druck abdestilliert und das so erhaltene bräunliche Öl mit 80 mL DCM aufgenommen. Die organische Phase wird 3-mal mit jeweils 30 mL Wasser gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel abdestilliert. Das so erhaltene Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie über Kieselgel (KG 60) mit einem Gradienten von 100 % Ethylacetat bis zu einer Mischung von Ethylacetat/MeOH 1:1, über 7 Säulenvolumina gereinigt. Es werden 453 mg (0.60 mmol) des Produkts **31** als hellbraunes, viskoses Öl erhalten.

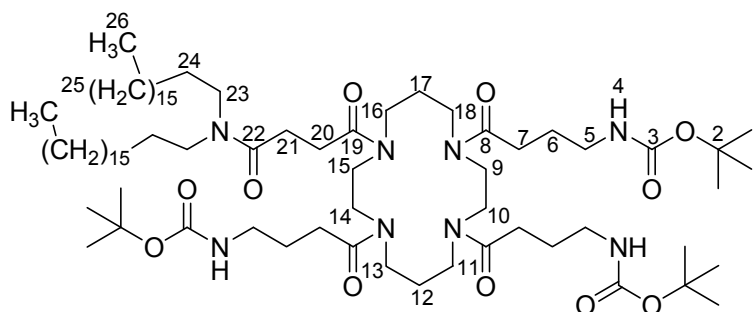
**Ausbeute:** 91 %; **R<sub>f</sub>** = 0.24 (EA/MeOH = 3:1); **<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz):  $\delta$ [ppm] = 1.41 (s, 27H, H-1); 1.83 (m, 8H, H-6, H-18); 2.36 (m, 8H, H-7, H-12); 2.62 (m, 2H, H-15); 2.85 (m, 2H, H-17); 3.15 (m, 6H, H-5); 3.44 (m, 12H, H-9, H-10, H-11, H-13, H-14, H-19); 4.78 (m, 3H, H-4); 5.13 (m, 1H, H-16). **<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 125.7 MHz):  $\delta$ [ppm] = 25.40 (C-12); 25.64 (C-6); 28.49 (C-1); 29.08 (C-18); 30.53 (C-7); 40.01 (C-5); 40.38-40.63 (C-9, C-10, C-11, C-13, C-14, C-15, C-17, C-19); 79.34 (C-2); 156.20 (C-3); 173.00 (C-8). **HRMS** (ESI pos., MeOH): ber. für

$\text{C}_{37}\text{H}_{70}\text{N}_7\text{O}_9$   $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$ : 756.5230, gef.:  $m/z$ : 756.5231, ber. für  $\text{C}_{37}\text{H}_{69}\text{N}_7\text{NaO}_9$   
 $[\text{M}+\text{Na}]^+$   $m/z$ : 778.5049, gef.:  $m/z$ : 778.5053.



**Abbildung 91:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) von **31**.

**5.3.2.4. {4-[4,8-Bis-(4-*tert*-butoxycarbonylamino-butyl)-11-(3-dioctadecyl-carbamoyl-propion-yl)-1,4,8,11-tetraaza-cyclotetradec-1-yl]-4-oxo-butyl}-carbaminsäure-*tert*-butylester **32**<sup>[34, 77]</sup>**

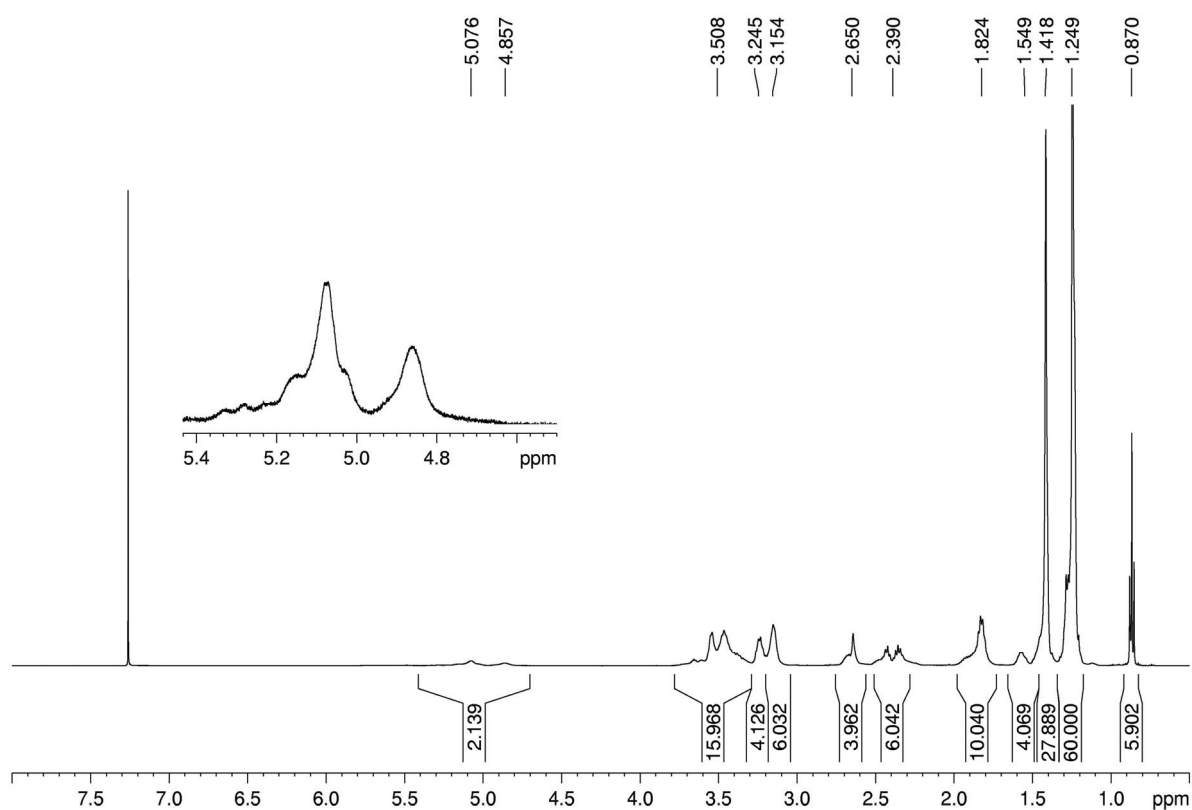


**Durchführung:**

312 mg (0.503 mmol, 1.0 eq.) Bernsteinsäure-*N,N*-dioctadecylamid (DODA-Suc) **29** werden in 30 mL abs. DCM gelöst und mit 123 mg (0.96 mmol, 170  $\mu$ L, 1.9 eq.) EDIPA und 226 mg (0.70 mmol, 1.4 eq.) TBTU versetzt. Diese Mischung wird 10 min. bei RT und unter Argonatmosphäre gerührt, bevor 380 mg (0.50 mmol, 1.0 eq.) **31** hinzugefügt werden. Die so erhaltene Reaktionsmischung wird für weitere 20 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer abdestilliert und das so erhaltene braune Öl mit 80 mL DCM aufgenommen. Die organische Phase wird dreimal mit jeweils 30 mL ges. NaCl-Lösung gewaschen und anschließend über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, bevor das Lösungsmittel abdestilliert wird. Das so erhaltene ölige Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie über Kieselgel (KG 60) gereinigt (Laufmittel: 150 mL Ethylacetat, anschließend Ethylacetat/MeOH 10:1). Es werden 560 mg (0.41 mmol) des Produkts **32** als gelb-braunes, viskoses Öl erhalten.

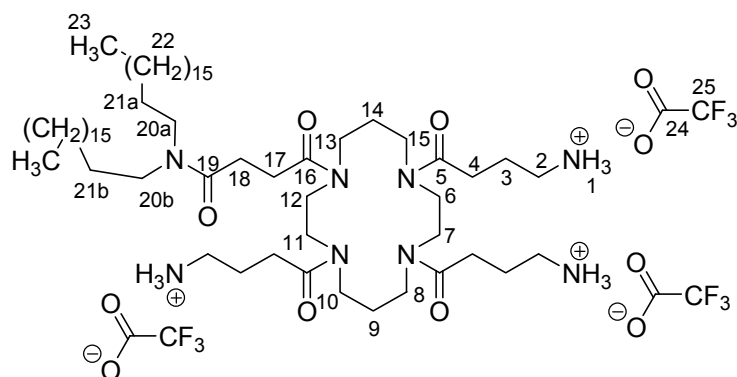
**Ausbeute:** 82 %;  $R_f$  = 0.18 (EA/MeOH 10:1); <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz):  $\delta$ [ppm] = 0.87 (t, 6H, H-26); 1.25 (m, 60H, H-25); 1.42 (s, 27H, H-1); 1.55 (m, 4H, H-24); 1.82 (m, 10H, H-6, H-12, H-17); 2.39 (m, 6H, H-7); 2.65 (m, 4H, H-20, H-21); 3.15 (m, 6H, H-5); 3.25 (m, 4H, H-23); 3.51 (m, 16H, H-9, H-10, H-11, H-13, H-14,

H-15, H-16, H-18); 4.86-5.08 (m, 3H, H-4). **HRMS** (ESI pos., MeOH) ber. für  $C_{77}H_{146}N_8NaO_{11}$   $[M+Na]^+$  m/z: 1382.1003, gef.: m/z: 1382.1049.



**Abbildung 92:**  $^1H$ -NMR-Spektrum (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) von **32**.

### 5.3.2.5 *N,N*-Diocetadecyl-4-oxo-4[4,8,11-*tris*-(4-aminobutyryl)-1,4,8,11-tetraaza-cyclotetradec-1-yl]butyramid-*tris*-trifluoracetatsalz **33**



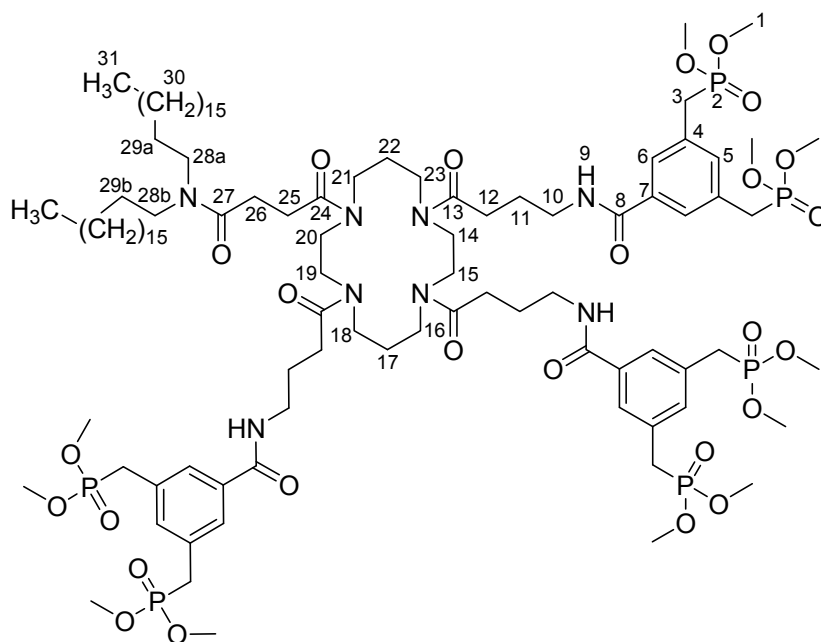
#### Durchführung:

560 mg (0.412 mmol) **32** werden in 10 mL abs. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst und unter Argon bei RT mit 5 mL TFA versetzt. Die Reaktionsmischung wird für 5 h bei RT unter Argonatmosphäre gerührt. Nach Zugabe von 5 mL abs. Benzen werden die flüchtigen Bestandteile im Vakuum abdestilliert. Der so erhaltene ölige Rückstand wird erneut mit 5 mL abs. Benzen aufgenommen und das Lösungsmittel erneut im Vakuum abdestilliert. Dieser Vorgang wird noch drei weitere Male wiederholt. Auf diese Weise werden 564 mg (40 mmol) des öligen, braun-gelben Trifluoracetatsalzes **33** erhalten.

**Ausbeute:** 98 %; **<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz):  $\delta$  [ppm] = 0.85 (t, 6H, H-23); 1.23 (m, 60H, H-22); 1.37 (m, 2H, H-21a) 1.52 (m, 2H, H-21b); 1.78 (m, 10H, H-3, H-9, H-14); 2.45 (m, 6H, H-4); 2.59 (m, 4H, H-17, H-18); 2.82 (m, 6H, H-2); 3.16 (m, 2H, H-20a); 3.22 (m, 2H, H-20b); 3.54 (m, 16H, H-6, H-7, H-8, H-10, H-11, H-12, H-13, H-15); 4.57 (m, 9H, H-1). **HRMS** (ESI pos., MeOH) ber. für C<sub>62</sub>H<sub>123</sub>N<sub>8</sub>O<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup> m/z: 1059.9611, gef.: m/z: 1059.9616.



**5.3.2.6. [3-{4-[4,8-Bis-{4-[3,5-bis-(dimethoxyphosphorylmethyl)benzoylamino]-butyryl]-11-(3-dioctadecylcarbamoylpropionyl)-1,4,8,11-tetraazacyclotetradec-1-yl]-4-oxobutylcarbamoyl}-5-(dimethoxyphosphorylmethyl)benzyl]-phosphonsäuremethylester **34**<sup>[239]</sup>**

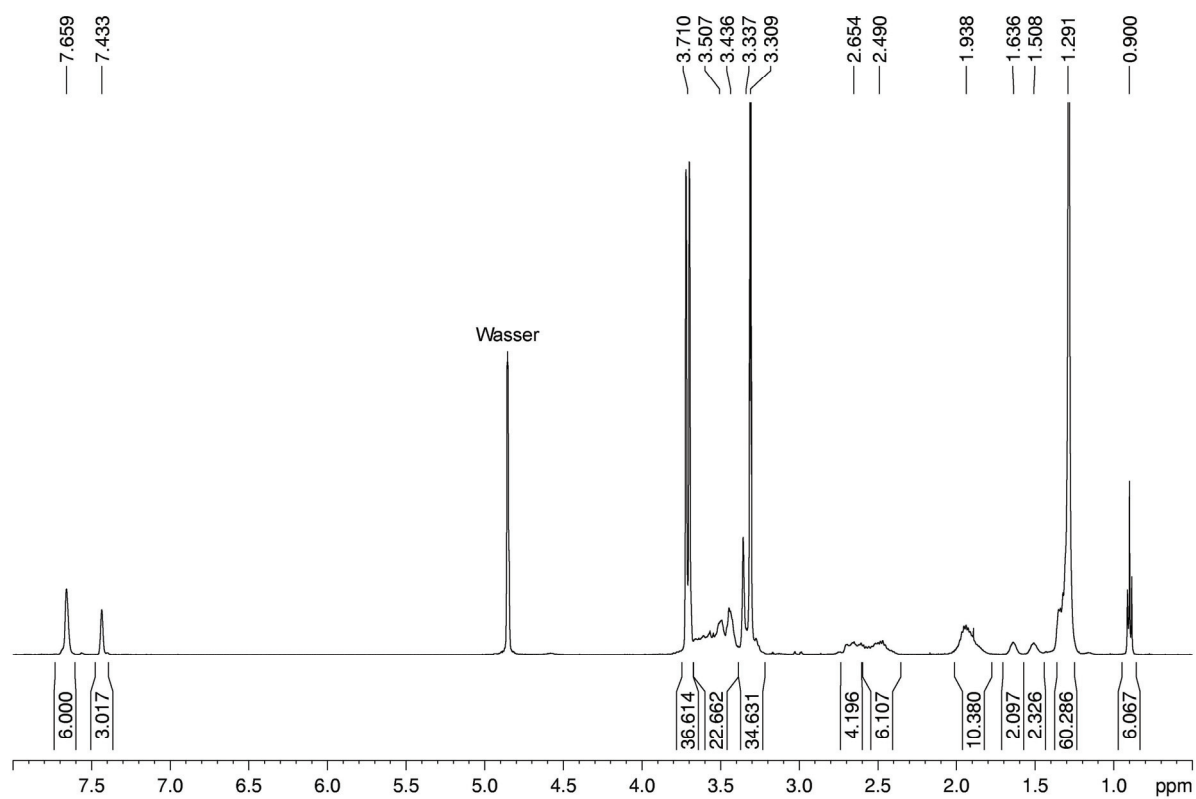


**Durchführung:**

355 mg (0.97 mmol, 3.1 eq.) 3,5-Bis-(dimethoxyphosphinylmethyl)benzoesäure **24** werden unter Argon in 35 mL abs. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst und im Eisbad auf 0 °C gekühlt. Anschließend werden 132 mg (0.97 mmol, 3.1 eq.) HOBt zugegeben und die Reaktionsmischung wird 10 min. gerührt, bevor 203 mg (1.07 mmol, 3.3 eq.) EDCI zugegeben werden. Es wird so lange gerührt, bis sich alles komplett gelöst hat (etwa 45 min.). Zu der Lösung werden 433 mg (0.31 mmol, 1.0 eq.) des Trifluoracetatsalzes **33** gegeben und die Mischung für 3 h bei 0 °C gerührt. Anschließend wird die Mischung auf RT erwärmt und weitere 48 h gerührt. Die organische Phase wird zweimal mit jeweils 25 mL ges. NaHCO<sub>3</sub>, einmal mit 25 mL Citronensäure (20 %) und einmal mit 25 mL ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen werden dreimal mit jeweils 50 mL DCM gegenextrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, das Lösungsmittel unter vermindertem

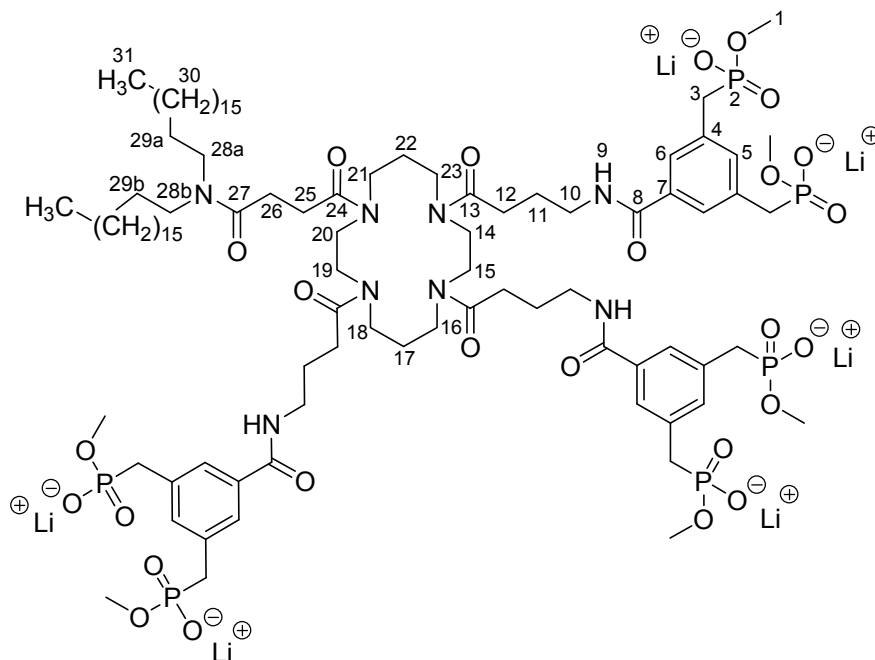
Druck am Rotationsverdampfer abdestilliert und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie über Kieselgel (KG 60, EA/MeOH 1:1) aufgereinigt. Es werden 293 mg (0.14 mmol) des Produkts **34** als weißer, kristalliner Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 45 %; **R<sub>f</sub>** = 0.14 (EA/MeOH 1:1); **Schmp.:** 129 °C; **<sup>1</sup>H-NMR** (MeOH-*d*<sub>4</sub>, 500 MHz):  $\delta$  [ppm] = 0.90 (t, 6H, H-31); 1.29 (m, 60H, H-30); 1.51 (m, 2H, H-29a) 1.64 (m, 2H, H-29b); 1.94 (m, 10H, H-11, H-17, H-22); 2.49 (m, 6H, H-12); 2.65 (m, 4H, H-25, H-26); 3.31 (m, 4H, H-28a, H-28b); 3.34 (d,  $^2J_{H,P}$  = 22.3 Hz, 12H, H-3); 3.44 (m, 6H, H-10); 3.51 (m, 16H, H-14, H-15, H-16, H-18, H-19, H-20, H-21, H-23); 3.71 (d,  $^3J_{H,P}$  = 10.8 Hz, 36H, H-1) 7.43 (m, 3H, H-5); 7.66 (m, 6H, H-6). **<sup>13</sup>C-NMR** (MeOH-*d*<sub>4</sub>, 125.7 MHz):  $\delta$  [ppm] = 14.60 (C-31), 23.89 (C-30), 26.26 (C-11), 28.09, 28.19, 28.96, 29.99, 30.58, 30.63, 30.81, 30.86, 30.94, 31.38, 31.49, 31.74 (C-17, C-22, C-29, C-30); 32.04 (C-12); 33.12 (C-25); 33.23 (C-26); 40.58 (C-10); 40.77, 40.88 (C-3); 47.61 (C-28), 48.08, 48.61, 48.99, 49.15 (C-14, C-15, C-16, C-18, C-19, C-20, C-21, C-23); 53.94 (C-1); 128.71 (C-6); 133.82 (C-4); 135.42 (C-5); 136.84 (C-7); 169.63, 169.74 (C-8); 173.69, (C-24, C-27); 175.30, 175.47, 175.60 (C-13). **<sup>31</sup>P-NMR** (MeOH-*d*<sub>4</sub>, 200 MHz) =  $\delta$  [ppm] = 29.74 (s, P-2). **HRMS** (ESI pos., MeOH) ber. für C<sub>101</sub>H<sub>176</sub>N<sub>8</sub>NaO<sub>26</sub>P<sub>6</sub> [M+Na]<sup>+</sup> m/z: 2126.1014, gef.: m/z: 2126.1171; ber. für C<sub>101</sub>H<sub>176</sub>N<sub>8</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>26</sub>P<sub>6</sub> [M+2Na]<sup>2+</sup> m/z: 1074.5453, gef.: m/z: 1074.5547; ber. für C<sub>101</sub>H<sub>176</sub>N<sub>8</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>26</sub>P<sub>6</sub> [M+3Na]<sup>3+</sup> m/z: 724.0266, gef.: m/z: 724.0302.



**Abbildung 93:** <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (MeOH-d<sub>4</sub>, 500 MHz) von **34**.

### 5.3.2.7. Rezeptorlipid (Lithiumsalz) **11**<sup>[16]</sup>

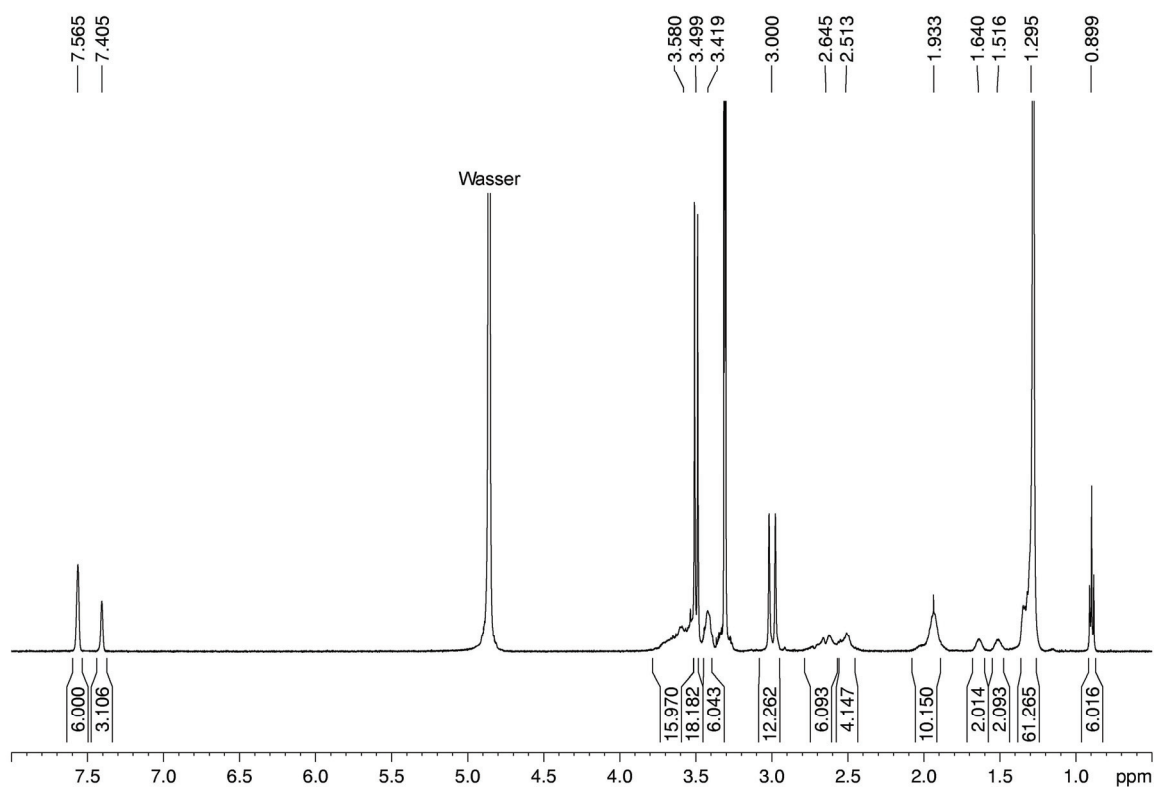


#### Durchführung:

150 mg (0.07 mmol, 1.0 eq.) **34** werden unter Argon in 20 mL abs. Acetonitril bei 82 °C gelöst und mit 46 mg (0.54 mmol, 7.5 eq.) trockenem LiBr versetzt. Die Reaktionsmischung wird 96 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf RT wird das als weißer Feststoff ausgefallene Lithiumsalz über eine D4 Fritte abfiltriert und dreimal mit jeweils 3 mL Acetonitril gewaschen. Der kristalline Feststoff wird im HV getrocknet. Es werden 143 mg (0.07 mmol) des weißen Lithiumsalzes **11** erhalten.

**Ausbeute:** 98 %; **Schmp.:** 394 °C (Zersetzung); **<sup>1</sup>H-NMR** (MeOH-*d*<sub>4</sub>, 500 MHz):  $\delta$  [ppm] = 0.90 (t, 6H, H-31); 1.30 (m, 60H, H-30); 1.52 (m, 2H, H-29a) 1.64 (m, 2H, H-29b); 1.93 (m, 10H, H-11, H-17, H-22); 2.51 (m, 6H, H-12); 2.65 (m, 4H, H-25, H-26); 3.00 (d,  $^2J_{\text{H,P}}$  = 20.7 Hz, 12H, H-3); 3.31 (m, 4H, H-28a, H-28b); 3.42 (m, 6H, H-10); 3.50 (d,  $^3J_{\text{H,P}}$  = 10.4 Hz, 18H, H-1); 3.58 (m, 16H, H-14, H-15, H-16, H-18, H-19, H-20, H-21, H-23); 7.41 (m, 3H, H-5); 7.56 (m, 6H, H-6); **<sup>13</sup>C-NMR** (MeOH-*d*<sub>4</sub>, 125.6 MHz):  $\delta$  [ppm] = 14.61 (C-31); 23.89 (C-30); 26.32 (C-11); 28.08, 28.20, 28.94, 29.99, 30.56, 30.63, 30.82, 30.86, 30.94, 31.44, 31.58, 31.61, (C-17, C-22, C-29,

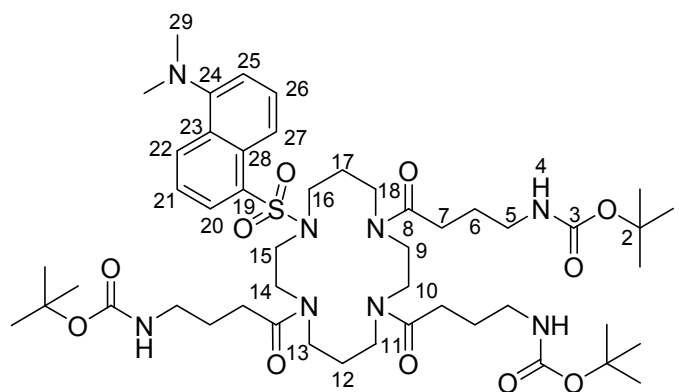
C-30); 32.74 (C-12); 33.23 (C-3); 35.15 (C-25); 36.13 (C-26); 40.55 (C-10); 47.63 (C-28); 48.05, 48.64, 48.95, 49.10 (C-14, C-15, C-16, C-18, C-19, C-20, C-21, C-23); 52.33 (C-1); 127.15 (C-6); 135.70 (C-4); 137.50 (C-5); 137.57 (C-7); 169.63, 169.74 (C-8); 171.26 (C-24, C-27); 175.53, 175.66 (C-13).  **$^{31}\text{P}$ -NMR** (MeOH- $d_4$ , 200 MHz):  $\delta$ [ppm] = 20.93 (s, P-2). **HRMS** (ESI neg., MeOH) ber. für  $\text{C}_{95}\text{H}_{158}\text{Li}_4\text{N}_8\text{O}_{26}\text{P}_6$   $[\text{M}-2\text{Li}]^{2-}$   $m/z$ : 1020.5186, gef.:  $m/z$ : 1020.5135; ber. für  $\text{C}_{95}\text{H}_{158}\text{Li}_2\text{N}_8\text{O}_{26}\text{P}_6$   $[\text{M}-4\text{Li}]^{4-}$   $m/z$ : 507.0022, gef.:  $m/z$ : 507.0012; ber. für  $\text{C}_{95}\text{H}_{159}\text{N}_8\text{O}_{26}\text{P}_6$   $[\text{M}-6\text{Li}+\text{H}]^{5-}$   $m/z$ : 402.9970, gef.:  $m/z$ : 402.9963; ber. für  $\text{C}_{95}\text{H}_{158}\text{LiN}_8\text{O}_{26}\text{P}_6$   $[\text{M}-5\text{Li}]^{5-}$   $m/z$ : 404.1987, gef.:  $m/z$ : 404.1989; ber. für  $\text{C}_{95}\text{H}_{158}\text{N}_8\text{O}_{26}\text{P}_6$   $[\text{M}-6\text{Li}]^{6-}$   $m/z$ : 335.6630, gef.:  $m/z$ : 335.6618.



**Abbildung 94:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (MeOH- $d_4$ , 500 MHz) von **11**.

### 5.3.3. Synthese des Cyclam-basierten BP-Rezeptors mit Dansyl-Markierung 12

#### 5.3.3.1. *tert*.-Butyl-4,4',4''-(11-dansyl-1,4,8,11-tetraazacyclotetradecan-1,4,8-triyl)-tris(4-oxobutan-1,4-diyl)tricarbammat **40**

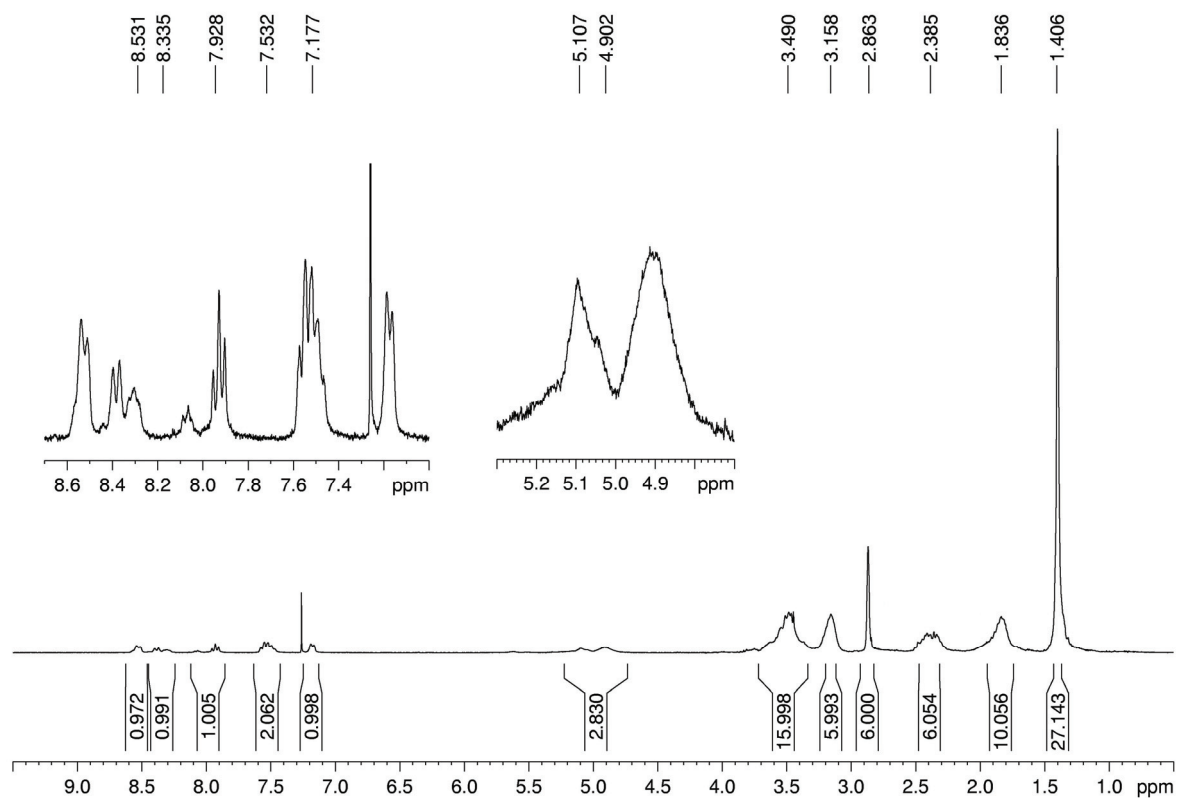


#### Durchführung:

170 mg (0.23 mmol, 1.0 eq.) **31** werden in 40 mL abs. DCM gelöst und mit 61 mg (0.23 mmol, 1.0 eq.) Dansylchlorid **39** und 57 mg (0.56 mmol, 78.5  $\mu$ L, 2.5 eq.) NEt<sub>3</sub> vermischt. Die Lösung wird bei RT unter Argonatmosphäre und Lichtausschluss für 24 h gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer im Vakuum abdestilliert und das so erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch über Kieselgel (KG 60, CH/EA 3:1 anschließend EA/MeOH 3:1) aufgereinigt. Dazu wird mit Cyclohexan/Ethylacetat 3:1 solange gespült, bis das Laufmittel farblos abfließt und keine Gelbfärbung mehr vorhanden ist. Anschließend wird das Produkt mit Ethylacetat/Methanol 3:1 isoliert. Es werden 158 mg (0.16 mmol) des Produkts **40** als gelb-grüner Feststoff erhalten.

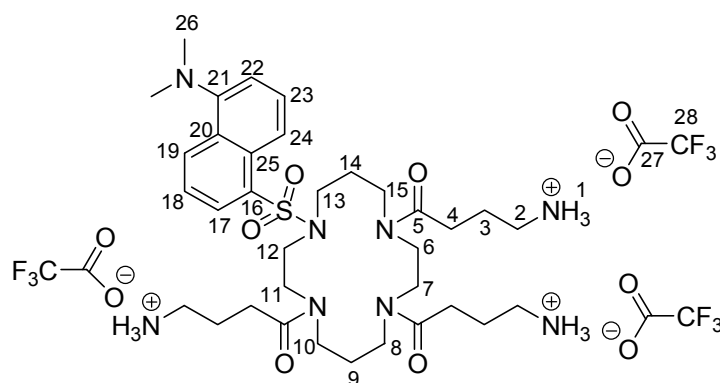
**Ausbeute:** 70 %; **R<sub>f</sub>** = 0.87 (EA/MeOH 3:1); **Schmp.:** 96 °C; **<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz):  $\delta$  [ppm] = 1.41 (s, 27H, H-1); 1.84 (m, 10H, H-6, H-12, H-17); 2.38 (m, 6H, H-7); 2.86 (s, 6H, H-29); 3.16 (m, 6H, H-5); 3.49 (m, 16H, H-9, H-10, H-11, H-13, H-14, H-15, H-16, H-18); 4.90-5.11 (m, 3H, H-4); 7.18 (m, 1H, H-25); 7.53 (m, 2H,

H-21, H-26); 7.93 (m, 1H, H-22); 8.33 (m, 1H, H-20); 8.53 (m, 1H, H-27). **HRMS** (ESI pos., MeOH) ber. für  $C_{49}H_{81}N_8O_{11}S$   $[M+H]^+$  m/z: 989.5740, gef.: m/z: 989.6756; ber. für  $C_{49}H_{80}N_8NaO_{11}S$   $[M+Na]^+$  m/z: 1011.56, gef.: 1011.5640.



**Abbildung 95:** <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) von 40.

### 5.3.3.2. 4,4',4''-(11-Dansyl-1,4,8,11-tetraazacyclotetradecan-1,4,8-triyl)tris(4-oxobutan-1-ammonium)-2,2,2-trifluoracetatsalz **41**



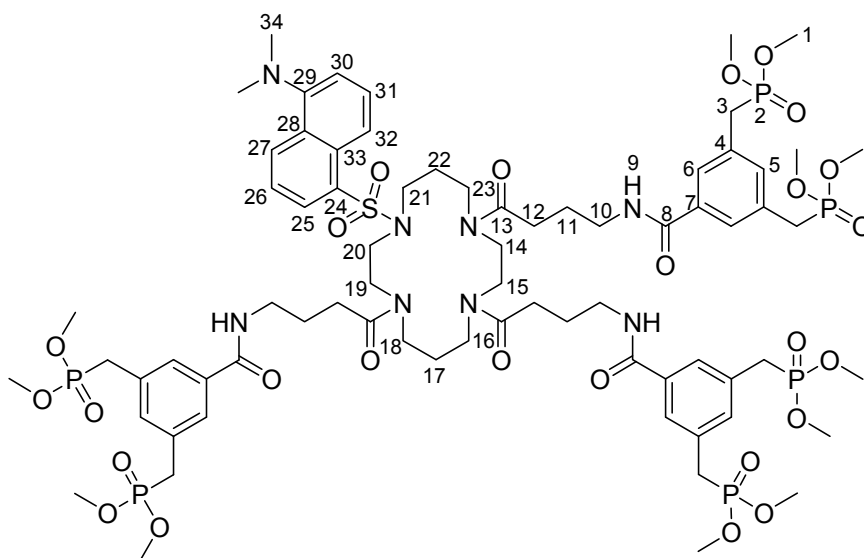
#### Durchführung:

83 mg (0.084 mmol) der Boc-geschützten Verbindung **40** werden in 10 mL abs. DCM unter Argonatmosphäre gelöst und bei RT mit 5 mL TFA versetzt. Die Mischung wird für 4 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer bei vermindertem Druck abdestilliert und der erhaltene Rückstand mit 5 mL abs. Benzen wieder aufgenommen. Das Lösungsmittel wird ebenfalls am Rotationsverdampfer abdestilliert und dieser Vorgang noch zweimal wiederholt. Es werden auf diese Weise 86 mg (0.084 mmol) des Produkts **41** als braun-gelbes Öl erhalten.

**Ausbeute:** 99 %; **<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>; 300 MHz):  $\delta$  [ppm] = 1.77 (m, 10H, H-3, H-9, H-14); 2.44 (m, 6H, H-4); 2.83 (m, 12H, H-2, H-26); 3.42 (m, 16H, H-6, H-7, H-8, H-10, H-11, H-12, H-13, H-15); 7.27 (d, 1H, H-22); 7.62 (q, 2H, H-18, H-23); 7.81 (m, 10H, H-1, H-19); 8.22 (m, 1H, H-17); 8.48 (m, 1H, H-24). **HRMS** (ESI pos., MeOH) ber. für C<sub>34</sub>H<sub>57</sub>N<sub>8</sub>O<sub>5</sub>S [M+H]<sup>+</sup> m/z: 689.4167, gef.: m/z: 689.4204; ber. für C<sub>34</sub>H<sub>56</sub>N<sub>8</sub>NaO<sub>5</sub>S [M+Na]<sup>+</sup> m/z: 711.3992, gef.: 711.4020.



**5.3.3.3. [3-{4-[4,8-Bis-{4-[3,5-bis(dimethoxyphosphorylmethyl)benzoylamino]-butyryl}-(11-dansyl)-1,4,8,11-tetraazacyclotetradec-1-yl]-4-oxobutylcarbamoyl}-5-(dimethoxyphosphorylmethyl)benzyl]phosphonsäuremethylester 42<sup>[239]</sup>**

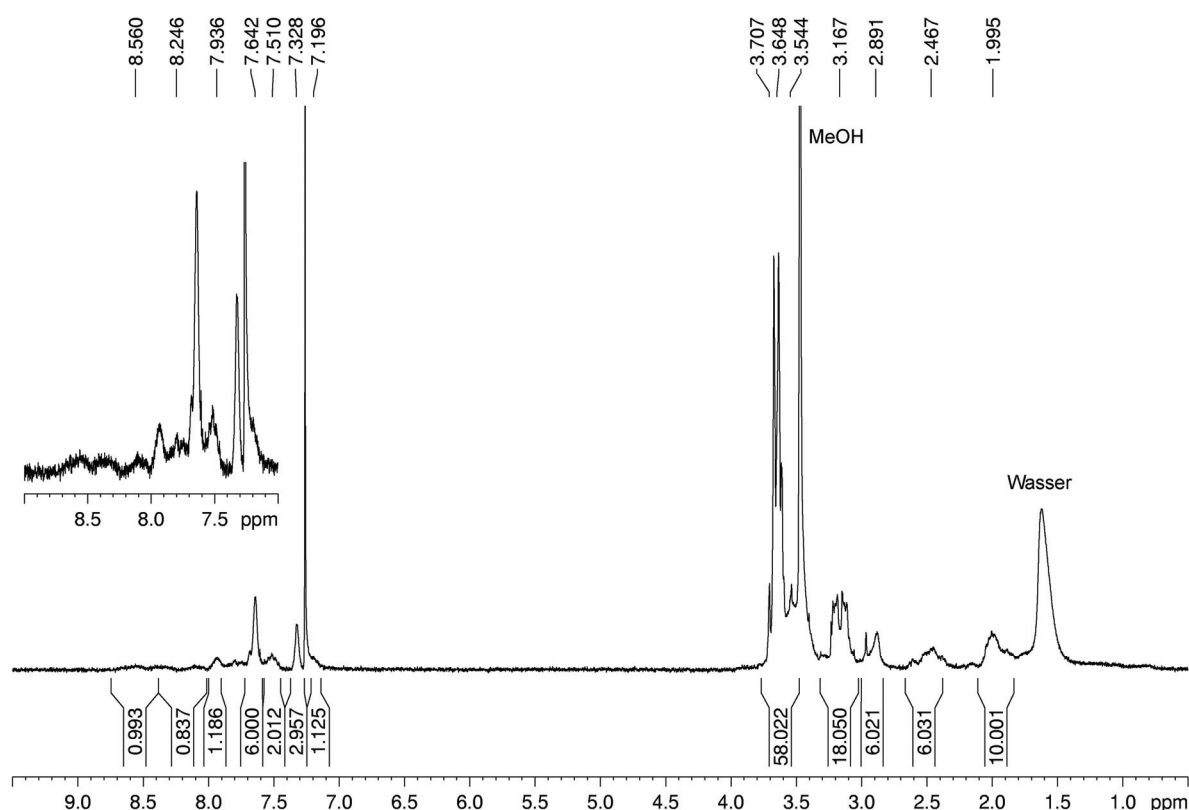


**Durchführung:**

92 mg (0.252 mmol, 3.03 eq.) der BP-Carbonsäure **24** werden unter Argon in 15 mL abs. DCM gelöst, auf 0 °C gekühlt und mit 65 mg (0.500 mmol, 89 µL, 6.02 eq.) EDIPA versetzt. Zu dieser Lösung werden anschließend 39 mg (0.252 mmol, 3.03 eq.) HOBt gegeben und 10 min. bei 0 °C gerührt. Es werden 52 mg (0.273 mmol, 3.30 eq.) EDCI zugegeben und so lange gerührt, bis sich alles vollständig gelöst hat (ca. 30 min.). Währenddessen werden 86 mg (0.083 mmol, 1.00 eq.) des TFA-Salzes **41** unter Argon in 5 mL abs. DCM und 5 mL abs. DMF gelöst und zur Reaktionsmischung gegeben. Die Mischung wird langsam bis auf RT erwärmt und für weitere 72 h bei RT gerührt. Anschließend wird die Mischung mit DCM auf ein Gesamtvolumen von 50 mL verdünnt und zweimal mit je 10 mL ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung, zweimal mit jeweils 15 mL Citronensäure (20 %) und einmal mit 15 mL ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen werden noch dreimal mit jeweils 20 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gegenextrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösungsmittel wird am

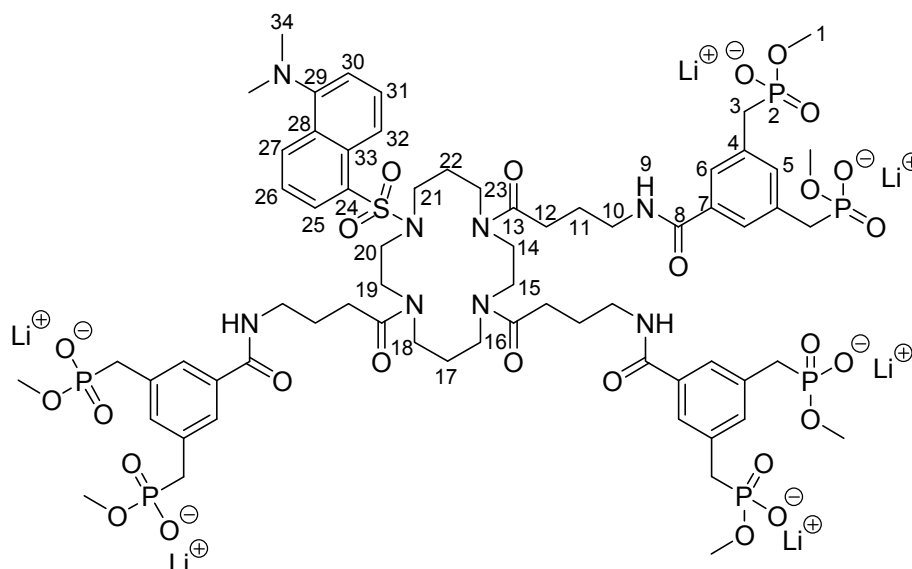
Rotationsverdampfer bei vermindertem Druck abdestilliert und das erhaltene gelbliche Rohprodukt säulenchromatographisch über Kieselgel (KG 60, EA/MeOH 3:1 und MeOH) gereinigt. Es werden 113 mg (0.065 mmol) des Produkts **42** als hell gelbgrünlicher Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 78 %; **R<sub>f</sub>** = 0.35 (MeOH); **Schmp.:** 143 °C; **<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz):  $\delta$  [ppm] = 2.00 (m, 10H, H-11, H-17, H-22); 2.47 (m, 6H, H-12); 2.89 (s, 6H, H-34); 3.17 (m, 18H, H-3, H-12); 3.54 (m, 16H, H-14, H-15, H-16, H-18, H-19, H-20, H-21, H-23); 3.65 (m, 36H, H-1); 3.71 (m, 6H, H-10); 7.20 (m, 1H, H-30); 7.33 (m, 3H, H-5); 7.51 (m, 2H, H-26, H-31); 7.64 (m, 6H, H-6); 7.94 (m, 1H, H-27); 8.25 (m, 1H, H-25); 8.56 (m, 1H, H-32). **<sup>31</sup>P-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz):  $\delta$  [ppm] = 28.30 (s, P-2). **HRMS** (ESI pos., MeOH) ber. für C<sub>73</sub>H<sub>110</sub>N<sub>8</sub>NaO<sub>26</sub>P<sub>6</sub>S [M+Na]<sup>+</sup> m/z: 1755.5570, gef.: m/z: 1755.5547; ber. für C<sub>73</sub>H<sub>110</sub>N<sub>8</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>26</sub>P<sub>6</sub>S [M+2Na]<sup>2+</sup> m/z: 889.2737, gef.: m/z: 889.2837; ber. für C<sub>73</sub>H<sub>110</sub>N<sub>8</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>26</sub>P<sub>6</sub>S [M+3Na]<sup>3+</sup> m/z: 600.5124, gef.: m/z: 600.5189.



**Abbildung 96:** <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) von **42**.

### 5.3.3.4. Fluoreszenzrezeptor (Lithiumsalz) **12**<sup>[16]</sup>

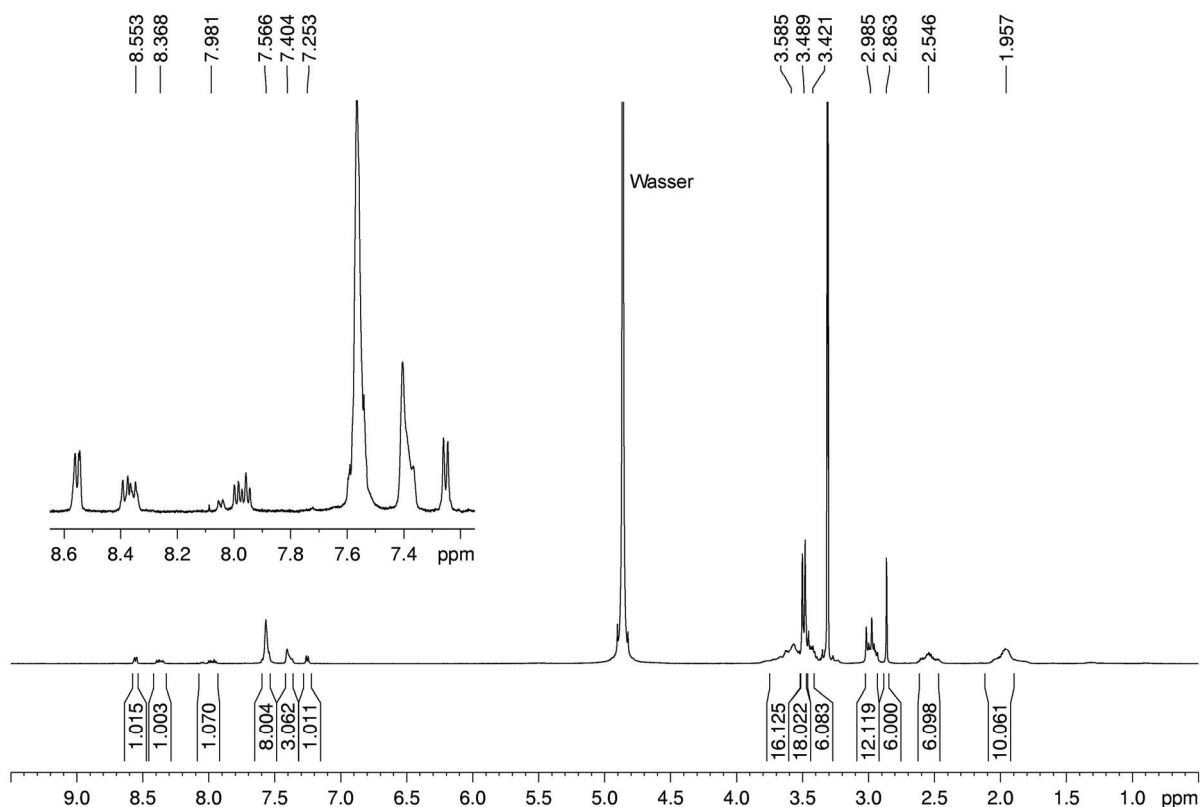


#### Durchführung:

27 mg (0.016 mmol, 1.0 eq.) **42** werden unter Argon in 10 mL abs. Acetonitril bei 82 °C gelöst und mit 10 mg (0.120 mmol, 7.5 eq.) trockenem LiBr versetzt. Die Reaktionsmischung wird 96 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf RT wird das als beigefarbener Feststoff ausgefallene Lithiumsalz über eine D4 Fritte abfiltriert und dreimal mit jeweils 3 mL kaltem Acetonitril gewaschen. Der kristalline Feststoff wird im HV getrocknet. Es werden 25 mg (0.015 mmol) des leicht bräunlich-beige farbenem Lithiumsalzes **12** erhalten.

**Ausbeute:** 94 %; **Schmp.:** 263 °C (Zersetzung); **<sup>1</sup>H-NMR** (MeOH-*d*<sub>4</sub>, 500 MHz):  $\delta$ [ppm] = 1.96 (m, 10H, H-11, H-17, H-22); 2.55 (m, 6H, H-12); 2.86 (s, 6H, H-34) 2.98 (d,  $^2J_{\text{H,P}}$  = 20.8 Hz, 12H, H-3), 3.42 (m, 6H, H-10); 3.49 (d,  $^3J_{\text{H,P}}$  = 10.4 Hz, 18H, H-1); 3.58 (m, 16H, H-14, H-15, H-16, H-18, H-19, H-20, H-21, H-23); 7.25 (m, 1H, H-30); 7.01 (m, 3H, H-5); 7.57 (m, 8H, H-6, H-26, H-31); 7.98 (m, 1H, H-27), 8.37 (m, 1H, H-25), 8.55 (m, 1H, H-32). **<sup>13</sup>C-NMR** (MeOH-*d*<sub>4</sub>, 125.6 MHz):  $\delta$ [ppm] = 26.47 (C-11); 28.67, 28.90 (C-17, C-22); 35.09 (C-12); 36.15 (C-3); 45.94 (C-10); 52.33 (C-1); 55.00 (C-34); 116.75 (C-30); 121.10 (C-28); 122.15 (C-32); 122.37 (C-25);

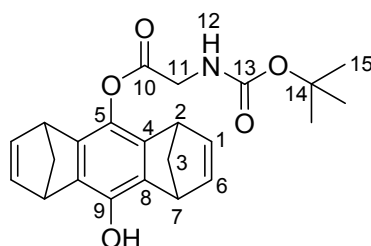
125.71 (C-26); 127.16 (C-6); 127.24 (C-31); 127.75 (C-31); 128.30 (C-27); 131.56 (C-33); 135.75 (C-4); 137.46 (C-5); 137.53 (C-7); 144.15 (C-24); 153.29 (C-29); 168.44 (C-8); 175.38 (C-13).  **$^{31}\text{P}$ -NMR** (MeOH- $d_4$ , 200 MHz):  $\delta$  [ppm] = 24.90 (s, P-2). **HRMS** (ESI neg., MeOH) ber. für  $\text{C}_{67}\text{H}_{92}\text{Li}_3\text{N}_8\text{O}_{26}\text{P}_6\text{S}$   $[\text{M}-3\text{Li}]^{3-}$  m/z: 554.4923, gef.: m/z: 554.4982; ber. für  $\text{C}_{67}\text{H}_{92}\text{Li}_2\text{N}_8\text{O}_{26}\text{P}_6\text{S}$   $[\text{M}-4\text{Li}]^{4-}$  m/z: 414.1153, gef.: m/z: 414.1142; ber. für  $\text{C}_{67}\text{H}_{93}\text{N}_8\text{O}_{26}\text{P}_6\text{S}$   $[\text{M}-6\text{Li}+\text{H}]^{5-}$  m/z: 328.6875, gef.: m/z: 328.6879.



**Abbildung 97:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (MeOH- $d_4$ , 500 MHz) von 12.

### 5.3.4. Synthese der asymmetrisch substituierten Pinzette anhand von Modellverbindungen

#### 5.3.4.1. *syn*-9-Hydroxy-10-(*tert*.-butylcarbonyl)glycinyloxyl-1,4,5,8-tetrahydro-1,4:5,8-dimethanoanthracen **44**

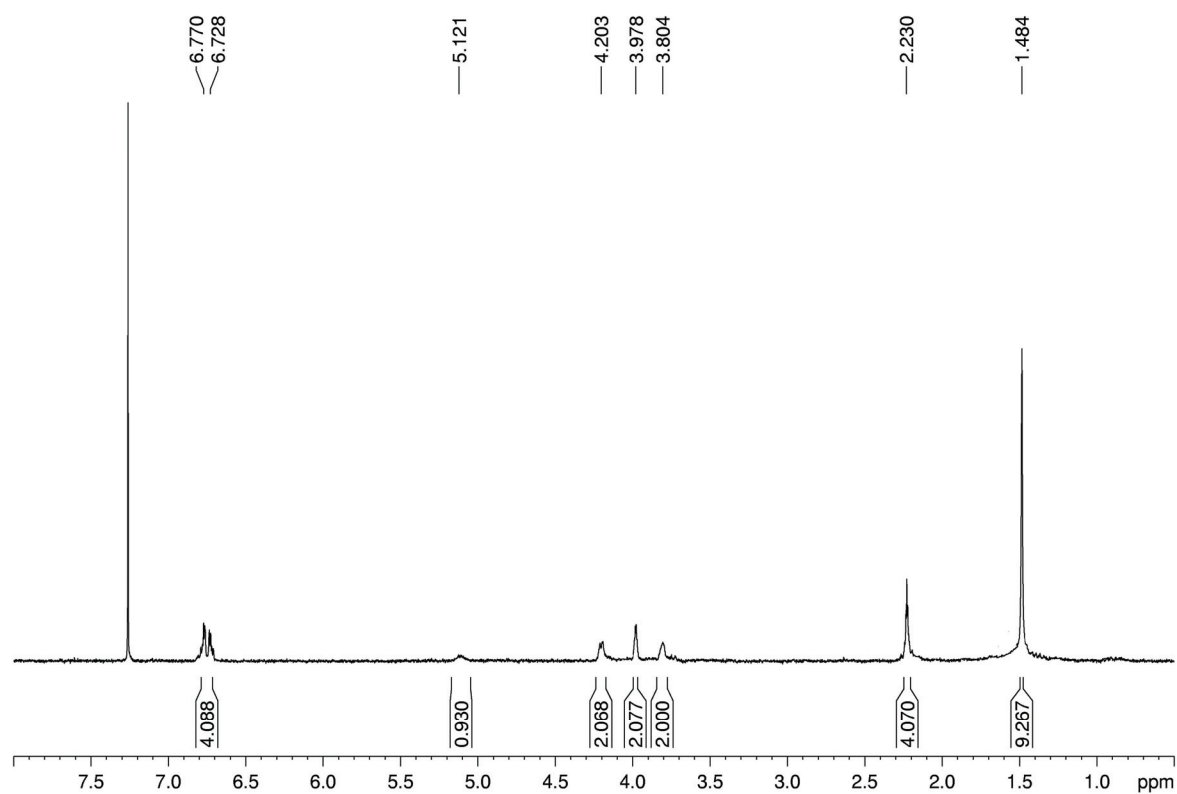


#### Durchführung:

50 mg (0.21 mmol, 1.00 eq.) 1,4,5,8-Tetrahydro-1,4,5,8-dimethanoanthracen-9,10-diol (Hydrochinonspacer) **43** werden unter Argon in 10 mL abs. DCM gelöst und mit 37 mg (0.21 mmol, 1.00 eq.) Boc-Glycin-OH, 4 mg (0.03 mmol, 0.15 eq.) DMAP und 35 mg (0.23 mmol, 1.1 eq.) HOBt versetzt. Es werden 2 mL abs. THF zugegeben und die Reaktionsmischung 20 min. bei RT gerührt. Nachdem sich alles komplett gelöst hat, werden 27 mg (0.21 mmol, 27  $\mu$ L, 1.00 eq.) DIC zugegeben und die Mischung weitere 72 h bei RT gerührt. Die Lösung wird mit 10 mL DCM verdünnt und zweimal mit jeweils 15 mL 0.2 M HCl, einmal mit 15 mL ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und einmal mit 15 mL ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen werden einmal mit 30 mL DCM gegenextrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer abdestilliert und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch über Kieselgel (KG 60, Chloroform/Aceton 30:1) aufgereinigt. Es werden auf diese Weise 70 mg (0.18 mmol) des Produkts **44** als hellgelbes Öl erhalten.

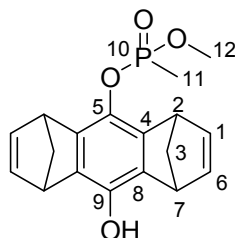
**Ausbeute:** 86 %; **R<sub>f</sub>** = 0.51 (Chloroform/Aceton 30:1); **<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz):  $\delta$  [ppm] = 1.48 (s, 9H, H-15); 2.23 (m, 4H, H-3); 3.80 (m, 2H, H-2) 3.98 (m, 2H H-7),

4.20 (m, 2H, H-11); 5.12 (m, 1H, H-12); 6.75 (m, 4H, H-1, H-6). **HRMS** (ESI pos., MeOH) ber. für  $C_{23}H_{25}NNaO_5$   $[M+Na]^+$  m/z: 418.1625, gef.: m/z: 418.1661.



**Abbildung 98:**  $^1H$ -NMR-Spektrum ( $CDCl_3$ , 300 MHz) von **44**.

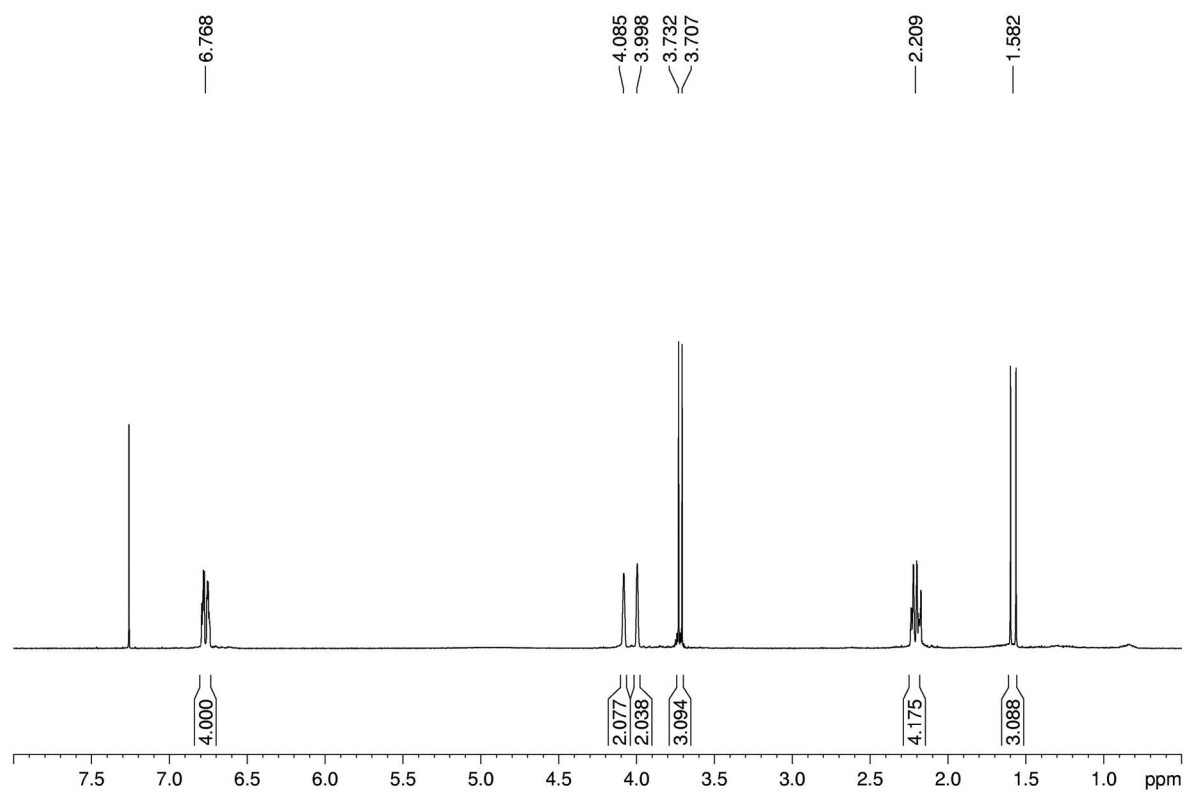
#### 5.3.4.2. *syn*-9-Hydroxy-10-(methoxymethoxyphosphoryloxy)-1,4,5,8-tetrahydro-1,4:5,8-dimethanoanthracen **45**



##### Durchführung:

50 mg (0.21 mmol, 1.0 eq.) 1,4,5,8-Tetrahydro-1,4,5,8-dimethanoanthracen-9,10-diol (Hydrochinonspacer) **43** werden unter Argon in 10 mL abs. THF gelöst und auf 0 °C gekühlt. Es werden 64 mg (0.63 mmol, 88 µL, 3.0 eq.) NEt<sub>3</sub> zugegeben und die Mischung für 10 min. bei 0 °C gerührt. Dann werden 28 mg (0.21 mmol, 19 µL, 1.0 eq.) Methylphosphonsäuredichlorid zugegeben und die Lösung 1 h bei 0 °C und anschließend 1 h bei RT gerührt, bevor 2 mL abs. Methanol zugegeben werden und die Mischung nochmals für 16 h bei RT gerührt wird. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck abdestilliert und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie über Kieselgel (KG 60, Chloroform/Aceton 3:1) gereinigt. Es werden 42 mg (0.13 mmol) des Produkts **45** als farbloses Öl erhalten.

**Ausbeute:** 62 %; **R<sub>f</sub>** = 0.48 (Chloroform/Aceton 3:1); **<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz):  $\delta$  [ppm] = 1.58 (d, <sup>2</sup>J<sub>H,P</sub> = 16.6 Hz, 3H, H-11); 2.21 (m, 4H, H-3); 3.72 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,P</sub> = 11.1 Hz, 3H, H-12) 4.00 (m, 2H H-2), 4.09 (m, 2H, H-7); 6.77 (m, 4H, H-1, H-6). **<sup>31</sup>P-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz):  $\delta$  [ppm] = 28.81 (s, P-10). **HRMS** (ESI pos., MeOH) ber. für C<sub>18</sub>H<sub>20</sub>O<sub>4</sub>P [M+H]<sup>+</sup> m/z: 331.1094, gef.: m/z: 331.1095; ber. für C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>NaO<sub>4</sub>P [M+Na]<sup>+</sup> m/z: 353.0913, gef.: m/z: 353.0917.

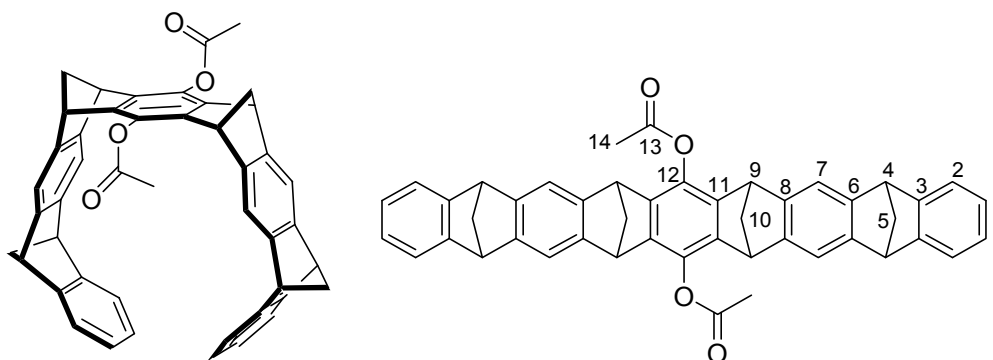


**Abbildung 99:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) von **45**.



### 5.3.5. Synthese der asymmetrisch substituierten Phosphatpinzette 17

#### 5.3.5.1. 8,19-Diacetoxy-5,7,9,11,16,18,20,22-octahydro-5,22:7,20:9,18:11,16-tetramethanononacen (Acetatpinzette) 53<sup>[178, 239]</sup>



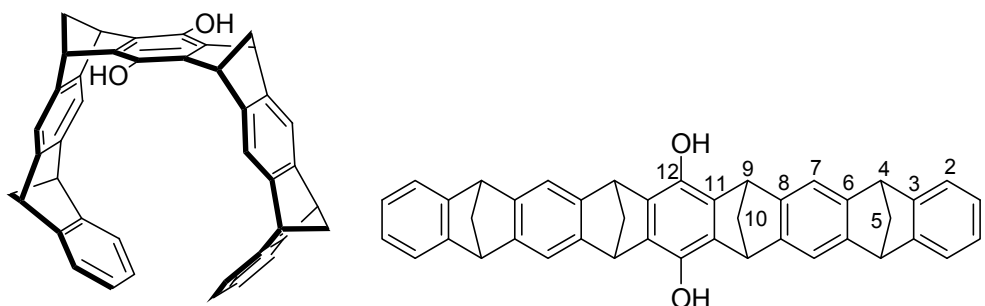
#### Durchführung:

400 mg (0.61 mmol, 1.00 eq.) des Diels-Alder-*Bis*-Addukts (8,19-Diacetoxy-5,6,6a,7,9,9a,10,11,16,17,17a,18,20,20a,21,22-hexadecahydro-5,22:7,20:9,18:11,16-tetramethanononacen) **52** werden in 30 mL abs. Toluol unter Argonatmosphäre suspendiert und zum Sieden erhitzt. Es werden portionsweise (etwa alle 5 min. eine Spatelspitze) 1.00 g (4.40 mmol, 7.20 eq.) DDQ zugegeben. Nach vollständiger Zugabe wird die braune Reaktionsmischung zur Vervollständigung der Reaktion noch 2 h unter Rückfluss gekocht. Die Mischung wird bis auf 60 °C abgekühlt und mit 254 mg (3.17 mmol, 300 µL, 5.20 eq.) 1,4-Cyclohexadien versetzt und bei 60 °C noch weitere 5 min. gerührt, bis die Mischung auf RT abgekühlt, und der ausgefallene braune Feststoff von DDQH<sub>2</sub> über eine D4-Fritte abfiltriert wird. Der abfiltrierte Feststoff wird dreimal mit jeweils 30 mL DCM versetzt und für 10 min. im Ultraschallbad behandelt. Der braune Feststoff wird wiederum abfiltriert und die organischen Filtrate vereinigt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer bei vermindertem Druck abdestilliert und der zurückbleibende Feststoff wird mit 3 mL DCM aufgenommen und säulenchromatographisch über 100 g Kieselgel (KG 60, Cyclohexan/Ethylacetat 3:1) aufgereinigt. Der erhaltene bräunliche Feststoff wird aus

Toluen umkristallisiert und im HV getrocknet. Man erhält so 297 mg (0.46 mmol) des Produkts **53** in Form eines weißen Feststoffs.

**Ausbeute:** 76 %; **R<sub>f</sub>** = 0.47 (CH/Ea 3:1); **Schmp.:** 328 °C; **<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz):  $\delta$ [ppm] = 2.32 (m, 2H, H-10a); 2.35 (s, 6H, H-14); 2.42 (m, 4H, H-5); 2.51 (d, 2H, H-10i); 3.99 (s, 4H, H-4); 4.06 (s, 4H, H-9); 6.74 (m, 4H, H-1); 7.06 (m, 4H, H-2); 7.13 (s, 4H, H-7). **HRMS** (ESI pos., MeOH) ber. für C<sub>46</sub>H<sub>35</sub>O<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup> m/z: 651.2535, gef.: m/z: 651.2514; ber. für C<sub>46</sub>H<sub>34</sub>NaO<sub>4</sub> [M+Na]<sup>+</sup> m/z: 673.2355, gef.: m/z: 673.2393.

**5.3.5.2. 8,19-Dihydroxy-5,7,9,11,16,18,20,22-octahydro-5,22:7,20:9,18:11,16-tetramethanononacen (Hydrochinonpinzette) 54<sup>[178, 239]</sup>**

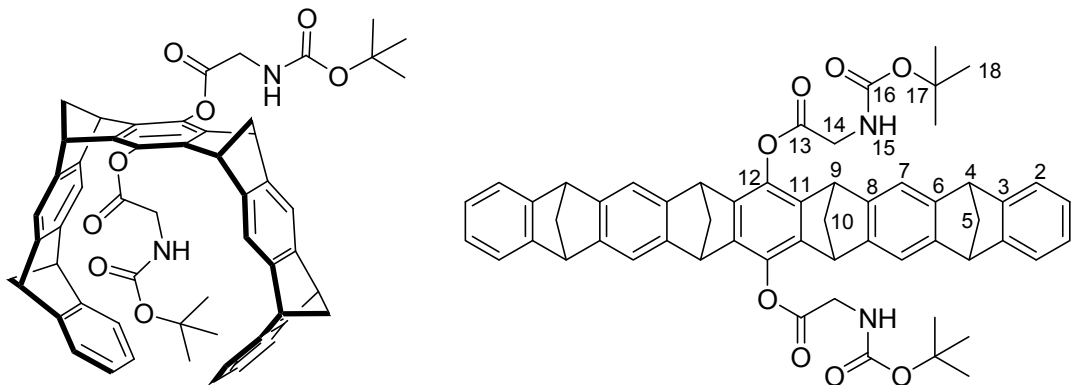


**Durchführung:**

87 mg (2.288 mmol, 8.26 eq.)  $\text{LiAlH}_4$  werden in 10 mL abs. THF unter Argon suspendiert und auf 0 °C gekühlt. Tropfenweise wird eine Suspension bestehend aus 180 mg (0.277 mmol, 1.00 eq.) Acetatpinzette **53** in 20 mL abs. THF zum vorgelegten  $\text{LiAlH}_4$  getropft. Nach vollständiger Zugabe wird die Reaktionsmischung auf RT erwärmt und anschließend 5 h unter Rückfluss gekocht. Die Mischung wird auf 0 °C gekühlt, unter Argonatmosphäre mit 10 mL ges.  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Lösung hydrolysiert und mit 1 M HCl auf einen pH-Wert von 1-2 angesäuert. Anschließend wird fünfmal mit jeweils 40 mL  $\text{CHCl}_3$  extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden dreimal mit je 30 mL ges. NaCl-Lösung und einmal mit 30 mL Wasser gewaschen und über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck abdestilliert und der erhaltene Feststoff im HV getrocknet. Es werden auf diese Weise 143 mg (0.252 mmol) der Hydrochinonpinzette **54** als weißer Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 91 %; **Schmp.:** 278 °C (Zersetzung);  **$^1\text{H-NMR}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  [ppm] = 2.38 (m, 4H, H-10); 2.44 (m, 4H, H-5); 4.07 (s, 4H, H-4); 4.22 (s, 4H, H-9); 6.76 (m, 4H, H-1); 7.07 (m, 4H, H-2); 7.15 (s, 4H, H-7). **HRMS** (ESI pos., MeOH) ber. für  $\text{C}_{42}\text{H}_{31}\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  m/z: 567.2319, gef.: m/z: 567.2337; ber. für  $\text{C}_{42}\text{H}_{30}\text{NaO}_2$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  m/z: 589.2138, gef.: m/z: 589.2159.

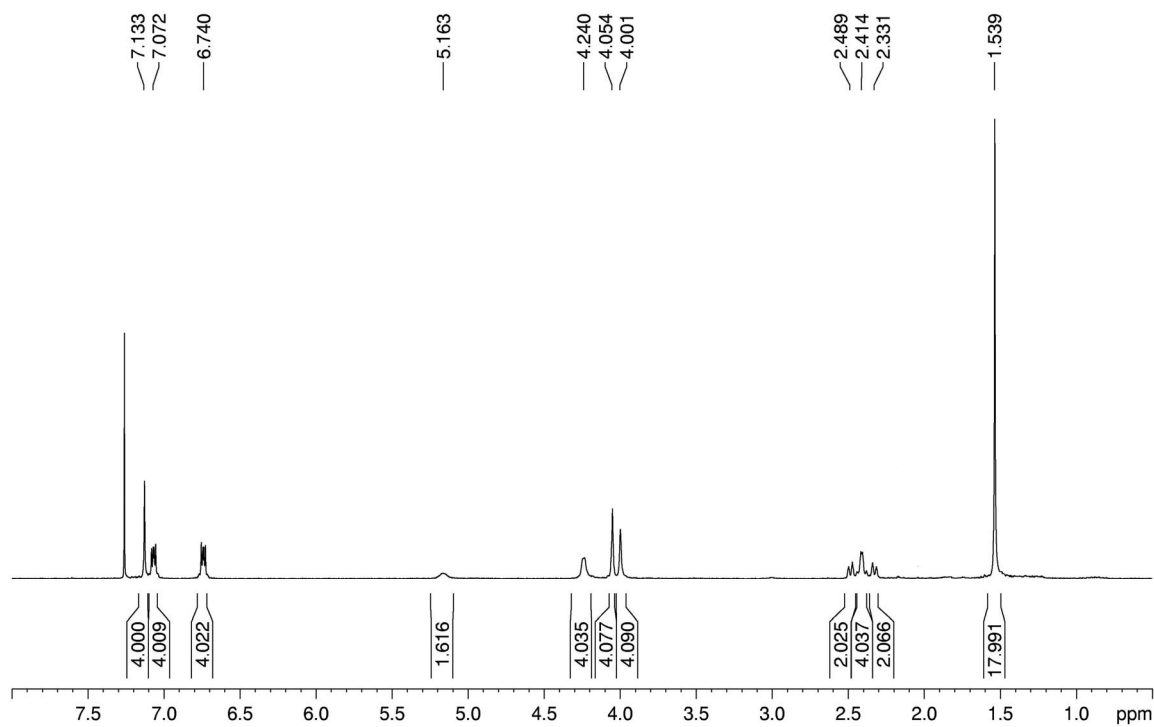
### 5.3.5.3. Di-Boc-Glycin-Pinzette **56**



#### Durchführung:

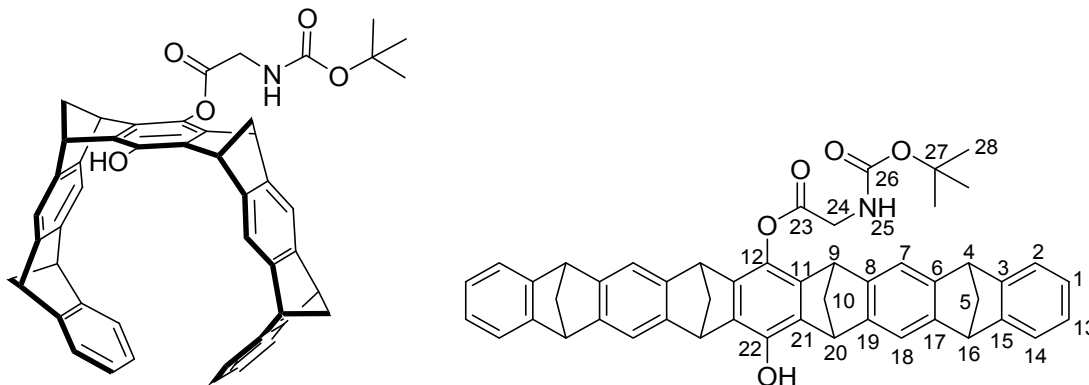
50 mg (0.088 mmol, 1.00 eq.) der Hydrochinonpinzette **54** werden unter Argon in 15 mL abs. DCM gelöst und in der Reihenfolge mit 27 mg (0.220 mmol, 2.50 eq.) DMAP, 16 mg (0.091 mmol, 1.03 eq.) Boc-Glycin-OH und 34 mg (0.176 mmol, 2.00 eq.) EDCI versetzt. Die Reaktionsmischung wird 16 h bei RT gerührt, anschließend mit 15 mL DCM verdünnt und zweimal mit je 10 mL 0.2 M HCl, einmal mit 10 mL ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und einmal mit 10 mL ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen werden mit 20 mL DCM gegenextrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer bei vermindertem Druck abdestilliert und das erhaltene Rohprodukt über Kieselgel (KG 60, CHCl<sub>3</sub>/Aceton 15:1) mittels Säulenchromatographie gereinigt und das Produkt im HV getrocknet. Man erhält auf diese Weise 33 mg (0.037 mmol) des disubstituierten Produkts **56** als hellbeige farbenen Feststoff.

**Ausbeute:** 41 %; **R<sub>f</sub>** = 0.67 (CHCl<sub>3</sub>/Aceton 15:1); **Schmp.:** 183 °C; **<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz):  $\delta$  [ppm] = 1.54 (s, 18H, H-18); 2.33 (m, 2H, H-10a); 2.41 (m, 4H, H-5); 2.49 (m, 2H, H-10i); 4.00 (s, 4H, H-14); 4.05 (s, 4H, H-4); 4.24 (s, 4H, H-9); 5.16 (bs, 2H, H-15); 6.74 (m, 4H, H-1); 7.07 (m, 4H, H-2); 7.13 (s, 4H, H-7). **HRMS** (ESI pos., MeOH) ber. für C<sub>56</sub>H<sub>52</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>8</sub> [M+Na]<sup>+</sup> m/z: 903.3621, gef.: m/z: 903.3698.



**Abbildung 100:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) von **56**.

#### 5.3.5.4. Mono-Boc-Glycin-Pinzette **58**

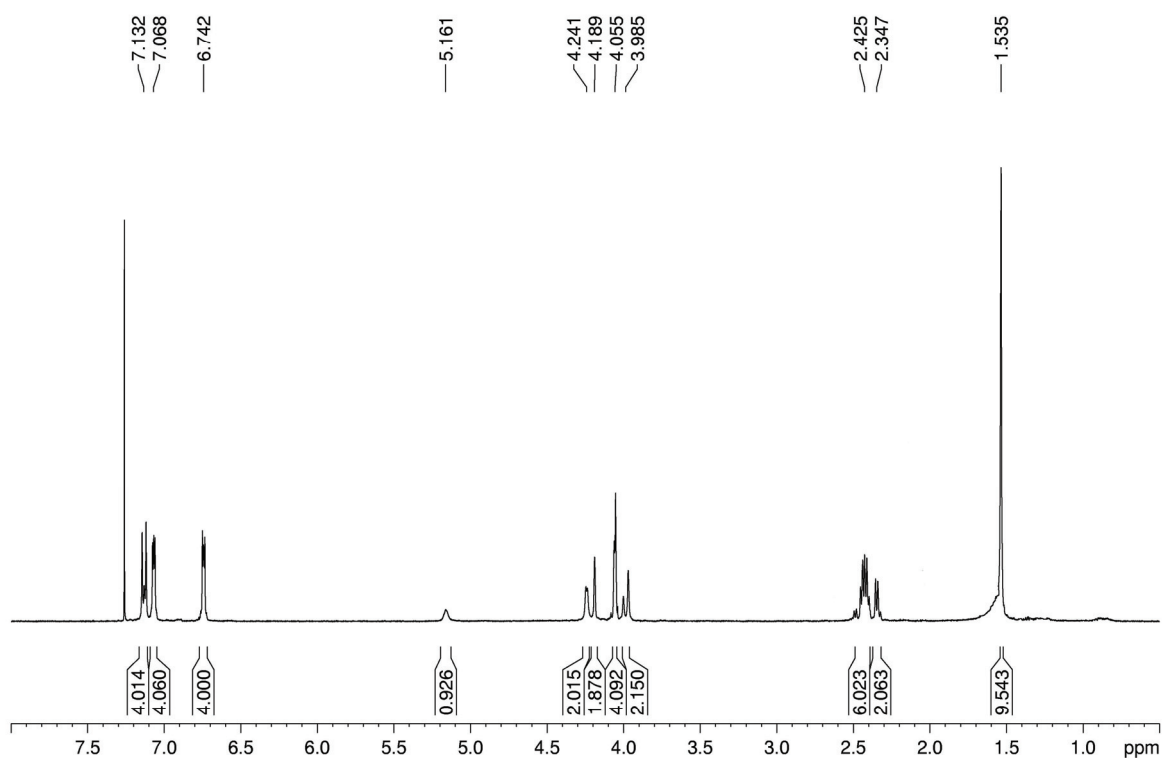


#### Durchführung:

50 mg (0.088 mmol, 1.0 eq.) der Hydrochinonpinzette **54** werden in 25 mL abs. DCM gelöst, mit 15 mg (0.088 mmol, 1.0 eq.) des Boc-geschützten Glycins und 46 mg (0.088 mmol, 1.0 eq.) PyBOP versetzt und für 5 min. bei RT unter Argonatmosphäre gerührt. Dann werden 27 mg (0.264 mmol, 30  $\mu$ L, 3.0 eq.) NMM zugegeben und die Reaktionsmischung für 86 h unter Rückfluss und Argon erhitzt. Nach dem Abkühlen auf RT wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck abdestilliert und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch über Kieselgel (KG 60, CHCl<sub>3</sub>/Aceton 15:1) gereinigt und im HV getrocknet. Es werden 43 mg (0.059 mmol) des Produkts **58** in Form eines beige-farbenen Feststoffs erhalten.

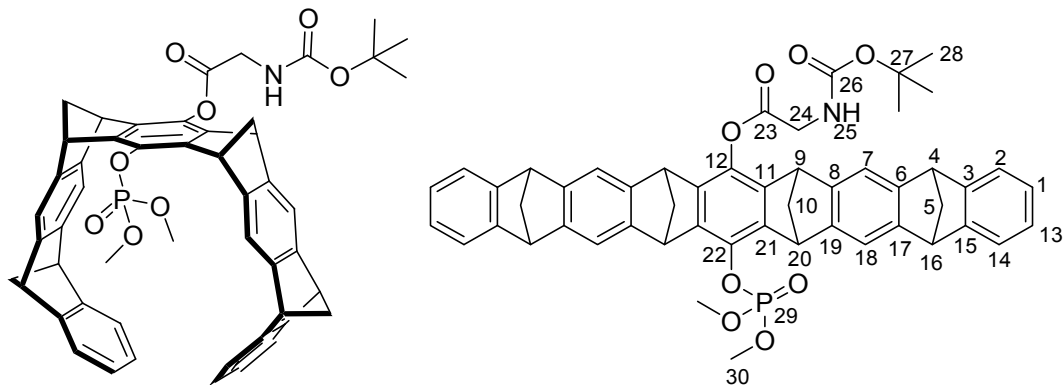
**Ausbeute:** 67 %; **R<sub>f</sub>** = 0.52 (CHCl<sub>3</sub>/Aceton 15:1); **Schmp.:** 176 °C; **<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz):  $\delta$ [ppm] = 1.53 (s, 9H, H-28); 2.35 (d, <sup>2</sup>J = 7.4 Hz, 2H, H-10a); 2.43 (m, 6H, H-5, H-10i); 3.96 (m, 2H, H-9); 4.06 (m, 4H, H-4, H-16); 4.19 (s, 2H, H-20); 4.24 (d, <sup>3</sup>J = 5.4 Hz, 2H, H-24); 5.16 (bs, 1H, H-25); 6.74 (m, 4H, H-1, H-13); 7.07 (m, 4H, H-2, H-14); 7.13 (m, 4H, H-7, H-18). **<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 125.8 MHz):  $\delta$ [ppm] = 28.57 (C-28); 42.64 (C-24); 47.49 (C-20); 48.85 (C-9); 51.40 (C-4, C-16); 69.07 (C-5); 70.31 (C-10); 80.41 (C-27); 116.41 (C-18); 116.83 (C-7); 121.56 (C-14); 121.68 (C-2); 124.76 (C-13); 124.80 (C-1); 133.44 (C<sub>q</sub>); 135.72 (C<sub>q</sub>); 140.84 (C<sub>q</sub>); 142.29 (C<sub>q</sub>); 146.50 (C<sub>q</sub>); 146.68 (C<sub>q</sub>); 147.69 (C<sub>q</sub>); 147.72 (C<sub>q</sub>); 150.41 (C<sub>q</sub>); 150.45 (C<sub>q</sub>);

156.01 (C-26); 168.82 (C-23). **HRMS** (ESI pos., MeOH) ber. für  $C_{49}H_{41}NNaO_5$   $[M+Na]^+$  m/z: 746.2877, gef.: m/z: 746.2952.



**Abbildung 101:**  $^1H$ -NMR-Spektrum ( $CDCl_3$ , 500 MHz) von **58**.

### 5.3.5.5. Boc-Glycin-Phosphat-Pinzette **60**<sup>[164]</sup>



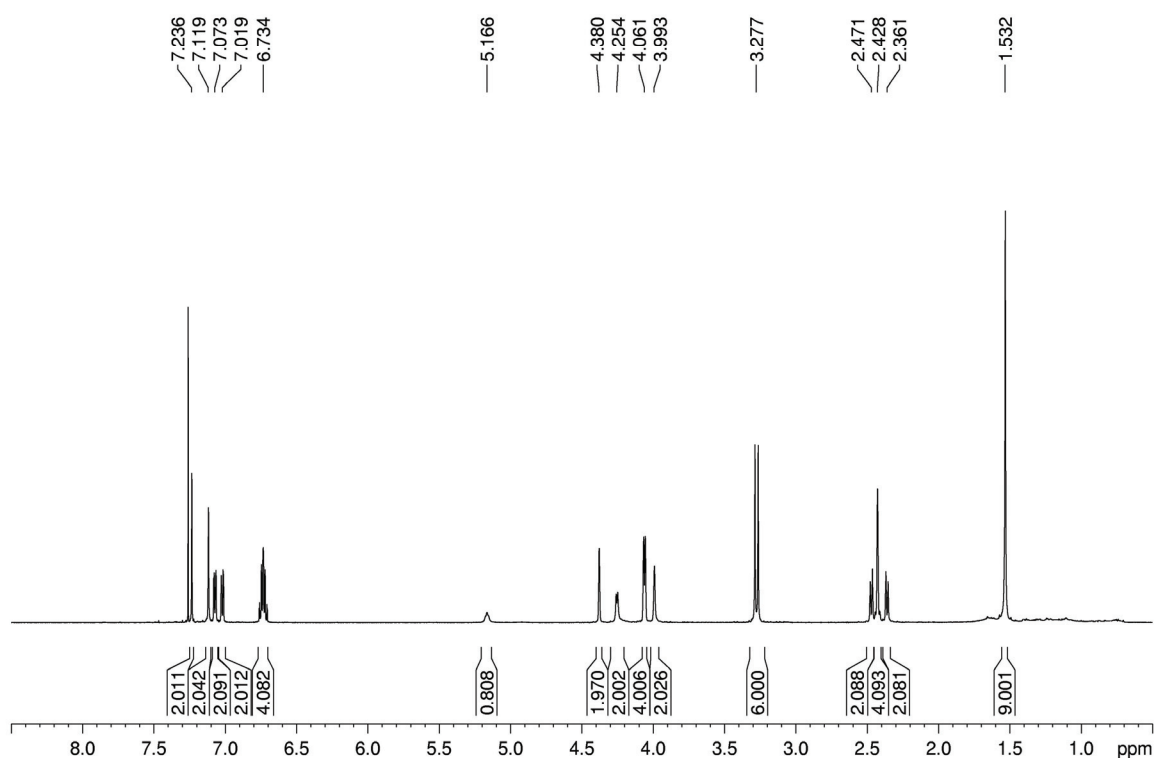
#### Durchführung:

61 mg (0.084 mmol, 1.0 eq.) der einseitig Boc-Glycin veresterten Pinzette **58** werden unter Argonatmosphäre in 15 mL abs. THF gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend werden 26 mg (0.168 mmol, 15  $\mu$ L, 2.0 eq.) POCl<sub>3</sub> zugegeben und 10 min. bei 0 °C gerührt. Nach Zugabe von 17 mg (0.168 mmol, 23  $\mu$ L, 2.0 eq.) NEt<sub>3</sub>, wird 1 h bei 0 °C und 1 h bei RT gerührt, bevor 2 mL abs. MeOH und 34 mg (0.336 mmol, 47  $\mu$ L, 4.0 eq.) NEt<sub>3</sub> zugegeben werden und die Mischung weitere 10 h bei RT gerührt wird. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer bei vermindertem Druck abdestilliert. Das erhaltene Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie über Kieselgel (KG 60, Chloroform/Aceton 15:1) isoliert und der erhaltene Feststoff im HV getrocknet. Es werden 36 mg (0.044 mmol) der unsymmetrisch substituierten Pinzette **60** erhalten.

**Ausbeute:** 52 %; **R<sub>f</sub>** = 0.47 (Chloroform/Aceton 15:1); **Schmp.:** 196 °C; **<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz):  $\delta$  [ppm] = 1.53 (s, 9H, H-26); 2.36 (d, <sup>2</sup>J = 7.7 Hz, 2H, H-10a); 2.43 (m, 4H, H-5); 2.47 (d, <sup>2</sup>J = 7.7 Hz, 2H, H-10i); 3.28 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,P</sub> = 11.2 Hz, 6H, H-30); 3.99 (s, 2H, H-9); 4.06 (d, <sup>3</sup>J = 5.6 Hz, 4H, H-5); 4.25 (d, <sup>3</sup>J = 5.5 Hz, 2H, H-24); 4.38 (s, 2H, H-11); 5.17 (bs, 1H, H-25); 6.73 (m, 4H, H-1, H-13); 7.02 (m, 2H, H-2); 7.07 (m, 2H, H-14); 7.12 (s, 2H, H-7); 7.24 (s, 2H, H-18). **<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 125.8 MHz):  $\delta$  [ppm] = 28.54 (C-28); 42.68 (C-24); 48.68 (C-20); 48.88 (C-9); 51.28 (C-4, C-16); 55.00 (C-30); 68.59 (C-5); 69.73 (C-10); 80.48 (C-27); 116.71 (C-18);

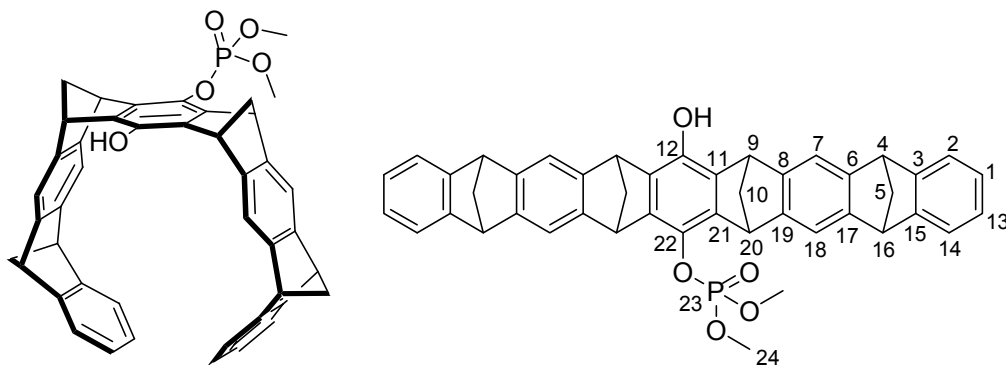


117.15 (C-7); 121.04 (C-14); 121.68 (C-2); 124.70 (C-13); 124.84 (C-1); 136.31 (C<sub>q</sub>); 136.93 (C<sub>q</sub>); 141.66 (C<sub>q</sub>); 142.14 (C<sub>q</sub>); 146.31 (C<sub>q</sub>); 146.68 (C<sub>q</sub>); 147.76 (C<sub>q</sub>); 147.93 (C<sub>q</sub>); 150.51 (C<sub>q</sub>); 150.62 (C<sub>q</sub>); 155.94 (C-26); 168.72 (C-23). **<sup>31</sup>P-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz):  $\delta$ [ppm] = -3.83 (s, P-29). **HRMS** (ESI pos., MeOH) ber. für C<sub>51</sub>H<sub>46</sub>NNaO<sub>8</sub>P [M+Na]<sup>+</sup> m/z: 854.2853, gef.: m/z: 854.2890.



**Abbildung 102:** <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) von **60**.

### 5.3.5.6. Hydroxy-Monophosphorsäuredimethylester Pinzette **59**



#### Durchführung:

14 mg (0.019 mmol, 1.0 eq.) der Mono-Boc-Glycin veresterten Pinzette **58** werden in 5 mL abs. THF unter Argon gelöst und auf 0 °C gekühlt. Es werden 20 mg (0.133 mmol, 13  $\mu$ L, 7.0 eq.) POCl<sub>3</sub> zugegeben und nach 10 min. Rühren bei 0 °C werden 4 mg (0.038 mmol, 6  $\mu$ L, 2.0 eq.) NEt<sub>3</sub> zugegeben und die Mischung für eine Stunde bei 0 °C unter Argonatmosphäre gerührt. Nach Zugabe von 500  $\mu$ L NEt<sub>3</sub> lässt man die Reaktionsmischung auf RT kommen und rührt eine weitere Stunde bei RT, bevor 2 mL abs. MeOH zugegeben werden. Nach weiteren 16 h bei RT wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer bei vermindertem Druck abdestilliert und das Rohprodukt säulenchromatographisch über Kieselgel (KG 60, Chloroform/Aceton 15:1) gereinigt. Das erhaltene Produkt wird im HV getrocknet. Es werden 5 mg (0.008 mmol) des Produkts **59** erhalten.

**Ausbeute:** 42 %; **R<sub>f</sub>** = 0.40 (Chloroform/Aceton 15:1); **Schmp.:** 153 °C; **<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz):  $\delta$  [ppm] = 2.38 (d;  $^2J$  = 7.5 Hz, 2H, H-10a); 2.42 (d,  $^2J$  = 7.5 Hz, 2H, H-10i); 2.44 (s, 4H, H-5); 3.15 (d,  $^3J_{H,P}$  = 11.3 Hz, 6H, H-24); 4.07 (d,  $^3J$  = 8.4 Hz, 4H, H-4, H-16); 4.21 (s, 2H, H-9); 4.36 (s, 2H, H-20); 6.74 (m, 4H, H-1, H-13); 7.03 (d,  $^2J$  = 7.1 Hz, 2H, H-2); 7.07 (d,  $^2J$  = 7.1 Hz, 2H, H-14); 7.13 (s, 2H, H-7); 7.25 (s, 2H, H-15). **<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 125.8 MHz):  $\delta$  [ppm] = 47.47 (C-9); 48.62 (C-20); 51.26 (C-4); 51.30 (C-16); 54.84 (C-24); 68.45 (C-5); 69.54 (C-10); 116.35 (C-18); 117.25

(C-7); 121.05 (C-16); 121.70 (C-4); 124.70 (C-13); 124.76 (C-1); 133.44 (C<sub>q</sub>); 136.50 (C<sub>q</sub>); 140.87 (C<sub>q</sub>); 141.77 (C<sub>q</sub>); 146.91 (C<sub>q</sub>); 147.00 (C<sub>q</sub>); 147.62 (C<sub>q</sub>); 147.74 (C<sub>q</sub>); 150.63 (C<sub>q</sub>); 150.79 (C<sub>q</sub>). **<sup>31</sup>P-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz):  $\delta$  [ppm] = -3.55 (s, P-23). **HRMS** (ESI pos., MeOH) ber. für C<sub>44</sub>H<sub>35</sub>NaO<sub>5</sub>P [M+Na]<sup>+</sup> m/z: 697.2120, gef.: m/z: 697.2162.

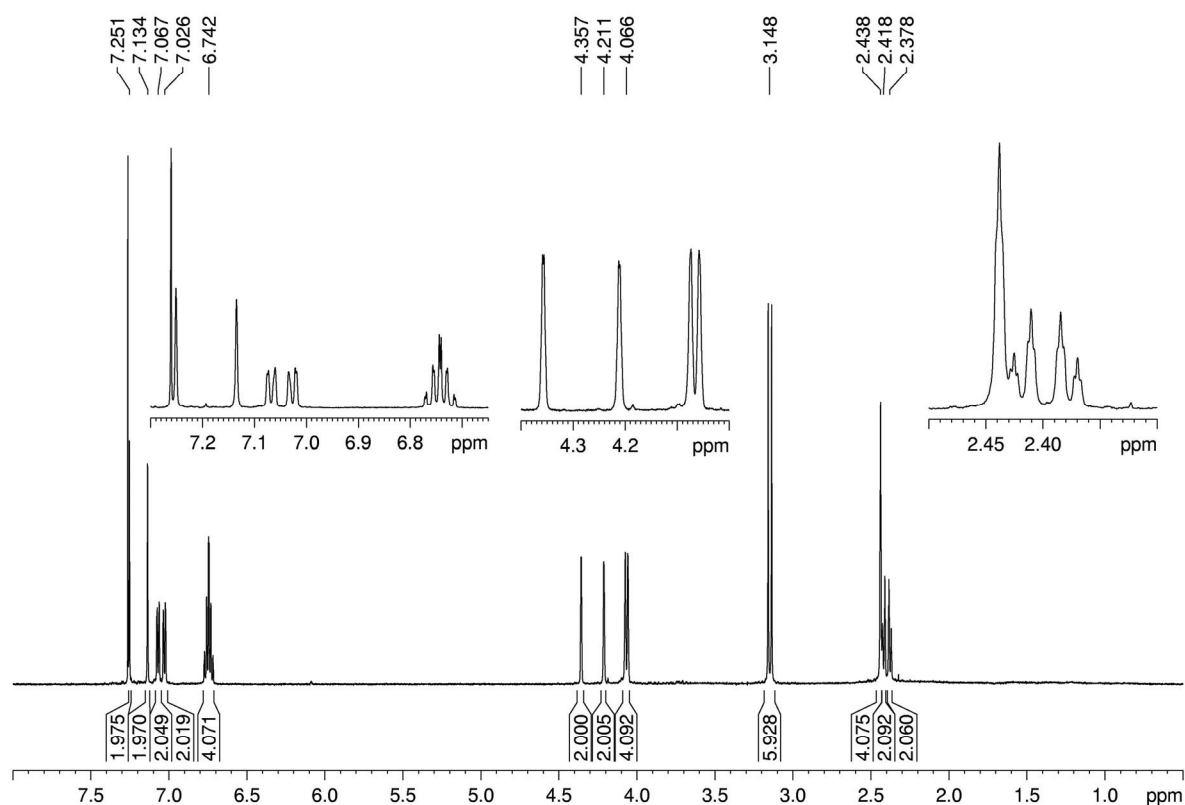
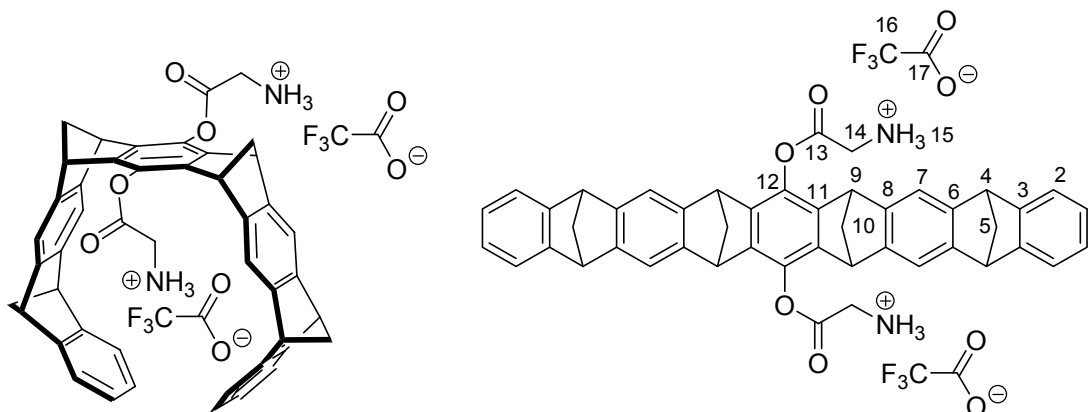


Abbildung 103: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) von 59.

### 5.3.5.7. Di-Glycintrifluoracetat veresterte Pinzette **57**

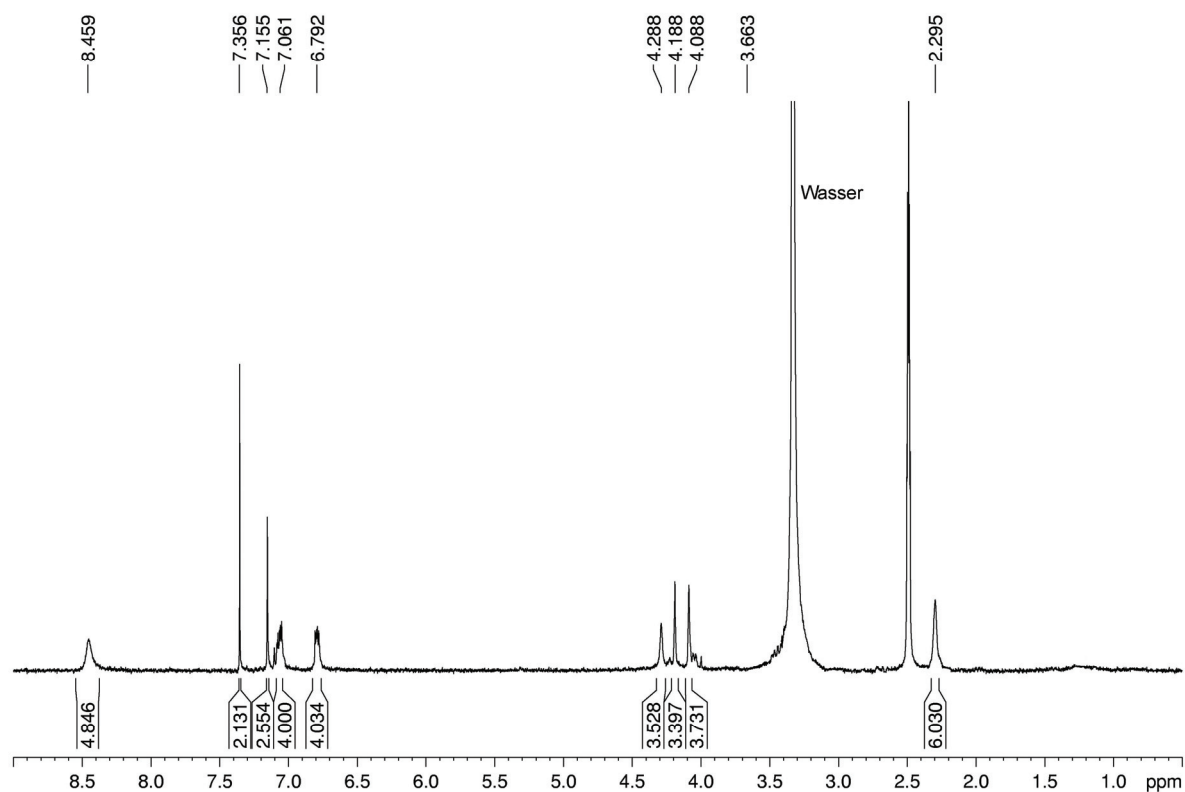


#### Durchführung:

50 mg (0.057 mmol) der Di-Boc-Glycin veresterten Pinzette **56** werden unter Argon in 15 mL abs. DCM gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wird langsam 1 mL TFA zugegeben und die Mischung für eine Stunde bei 0 °C gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel abkondensiert, der erhaltene Rückstand dreimal mit jeweils 5 mL abs. Benzen versetzt und das Lösungsmittel erneut abkondensiert. Das Produkt wird im HV getrocknet. Man erhält auf diese Weise 50 mg (0.055 mmol) des Produkts als Trifluoracetatsalz **57**.

**Ausbeute:** 97 %; **<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz):  $\delta$  [ppm] = 2.30 (m, 6H, H-10a, H-5); 2.50 (m, 2H, H-10i); 4.09 (s, 4H, H-14); 4.19 (s, 4H, H-9); 4.29 (s, 4H, H-4); 6.79 (m, 4H, H-1); 7.06 (m, 4H, H-2); 7.16 (s, 2H, H-7); 7.36 (s, 2H, H-7); 8.46 (bs 6H, H-15).

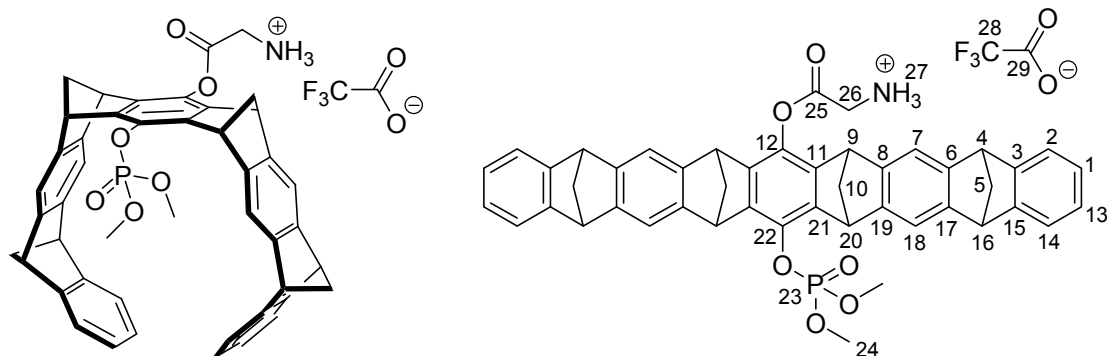
**HRMS** (ESI pos., MeOH) ber. für C<sub>46</sub>H<sub>37</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup> m/z: 681.2748, gef.: m/z: 681.3480.



**Abbildung 104:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum ( $\text{DMSO-d}_6$ , 300 MHz) von 57.

### 5.3.5.8. Glycinammoniumtrifluoroacetat-Phosphorsäuredimethylester

#### Pinzette 17



#### Durchführung:

20 mg (0.024 mmol) der Boc-Glycin-Phosphorsäuredimethylester Pinzette **60** werden unter Argon in 15 mL abs. DCM gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wird langsam 1 mL TFA zugegeben und die Mischung für eine Stunde bei 0 °C gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel abkondensiert und der erhaltene Rückstand dreimal mit jeweils 5 mL abs. Benzen versetzt und das Lösungsmittel erneut abkondensiert. Das Produkt wird im HV getrocknet. Man erhält auf diese Weise 19 mg (0.022 mmol) des Produkts als Trifluoroacetatsalz **17**.

**Ausbeute:** 92 %; **<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz):  $\delta$  [ppm] = 2.33 (m, 2H, H-10a); 2.37 (m, 4 H, H-5); 2.43 (m, 2H, H-10i); 3.43 (d,  $^3J_{\text{H,P}}$  = 11.1 Hz, 6H, H-24); 4.04 (m, 4H, H-4, H-16); 4.11 (m, 2H, H-9); 4.22 (m, 2H, H-26); 4.36 (m, 2H, H-20); 6.80 (m, 4H, H-1, H-13); 7.03 (m, 4H, H-2, H-14); 7.11 (m, 2H, H-7); 7.18 (m, 2H, H-18); 7.67 (m, 3H, H-27). **<sup>31</sup>P-NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 120 MHz):  $\delta$  [ppm] = -3.45 (s, P-23). **HRMS** (ESI pos., MeOH) ber. für C<sub>46</sub>H<sub>39</sub>NO<sub>6</sub>P [M+H]<sup>+</sup> m/z: 732.2515, gef.: m/z: 732.7957.

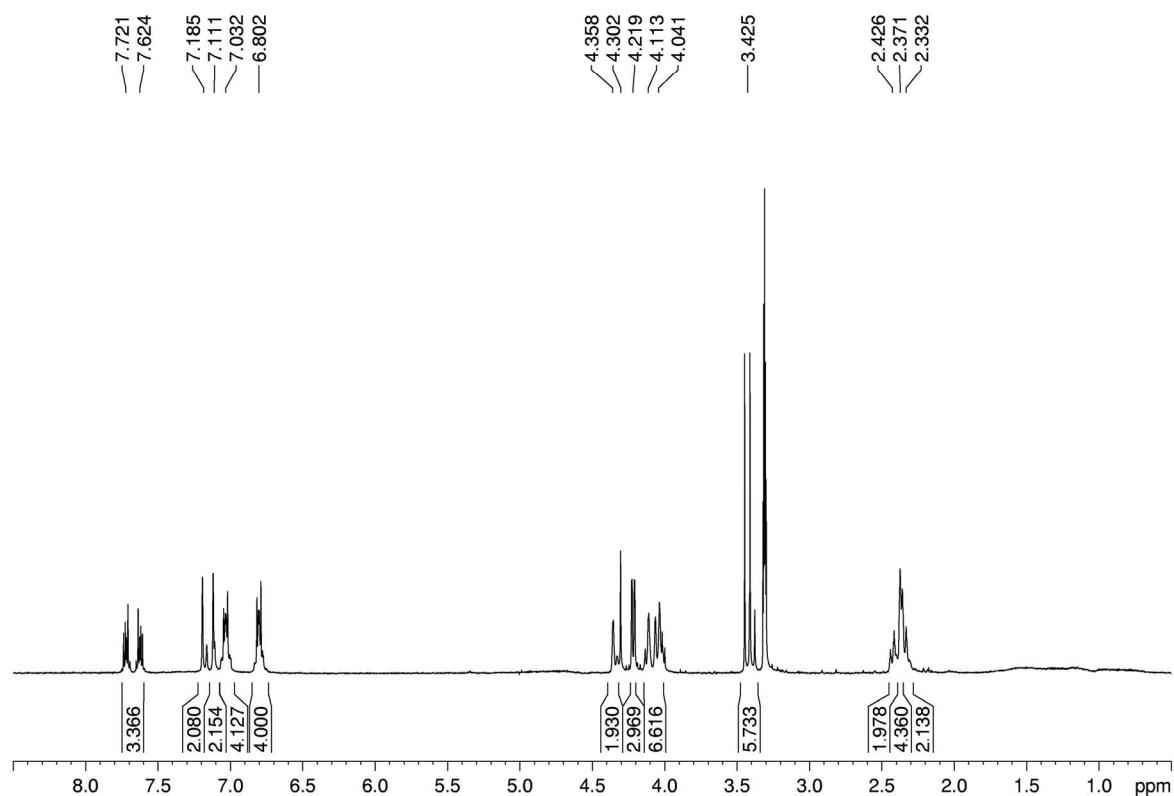
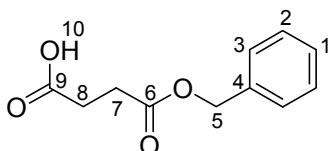


Abbildung 105: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (DMSO-d<sub>6</sub>, 300 MHz) von **17**.

### 5.3.6. Synthese des Cyclam-basierten Phosphatpinzetten-Rezeptors 19

#### 5.3.6.1. Bernsteinsäuremonobenzylester **63**<sup>[240]</sup>

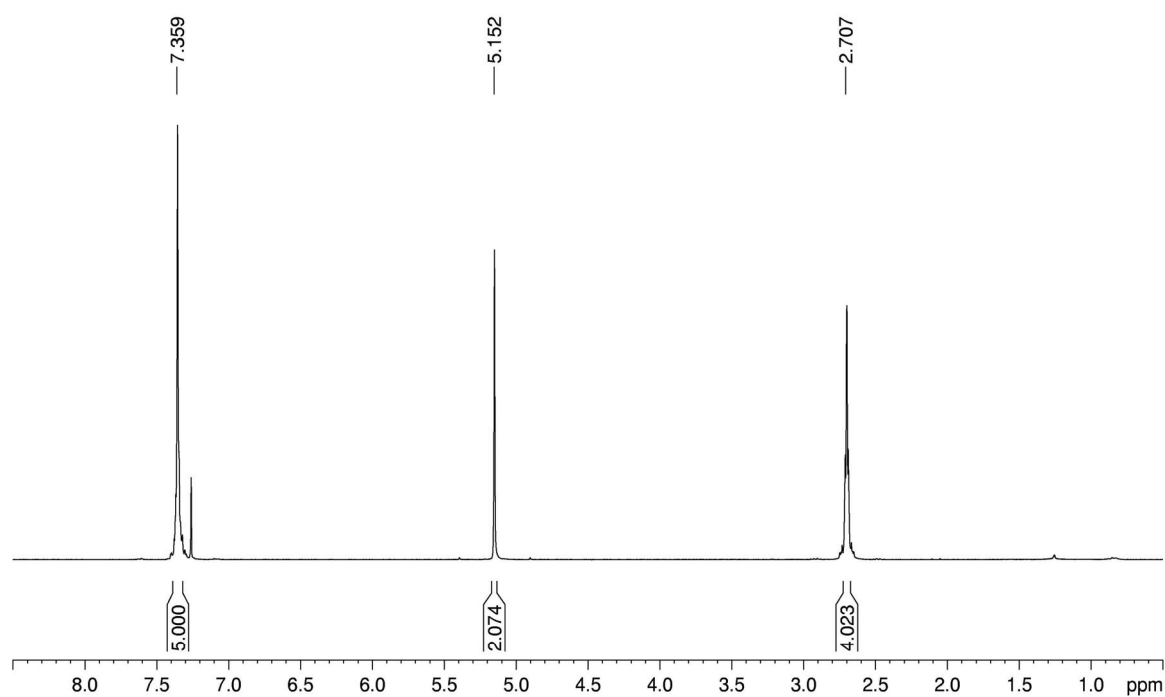


#### Durchführung:

1.00 g (10.0 mmol, 1.20 eq.) Bernsteinsäureanhydrid **28** werden zusammen mit 1.02 g (8.30 mmol, 1.00 eq.) DMAP und 0.90 g (8.30 mmol, 830  $\mu$ L, 1.00 eq.) Benzylalkohol **62** unter Argonatmosphäre in 30 mL abs. DCM gelöst und bei RT für 18 h gerührt. Anschließend wird die Mischung mit 20 mL 5 %iger  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung versetzt und für 5 min. gerührt. Nachdem die wässrige Phase von der Organischen abgetrennt wurde, wird die organische Phase mit 20 mL Wasser extrahiert und die wässrigen Phasen vereinigt, bevor diese mit 1 M HCl bis zur deutlich sauren Reaktion versetzt werden. Die wässrige Phase wird nun viermal mit jeweils 30 mL Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Phasen werden einmal mit 30 mL ges. NaCl-Lösung gewaschen und anschließend über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet. Nachdem das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck abdestilliert wurde wird das als weißer Feststoff erhaltene Produkt im HV getrocknet. Es können auf diese Weise 1.58 g (7.60 mmol) des Bernsteinsäuremonobenzylesters **63** isoliert werden.

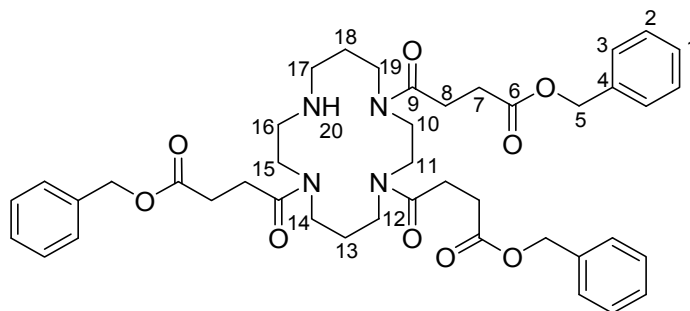
**Ausbeute:** 92 %; **Schmp.:** 55 °C;  **$^1\text{H-NMR}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  [ppm] = 2.71 (m, 4H, H-7, H-8); 5.15 (s, 2H, H-5); 7.34 (m, 5H, H-1, H-2, H-3).  **$^{13}\text{C-NMR}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 74.5 MHz):  $\delta$  [ppm] = 28.82 (C-8); 28.91 (C-7); 66.67 (C-5); 128.12 (C-3); 128.29 (C-1); 128.64 (C-2); 136.72 (C-4); 171.67 (C-6); 178.00 (C-9). **HRMS** (ESI pos., MeOH): ber. für  $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{NaO}_4$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  m/z: 231.0628, gef.: m/z: 231.0649.





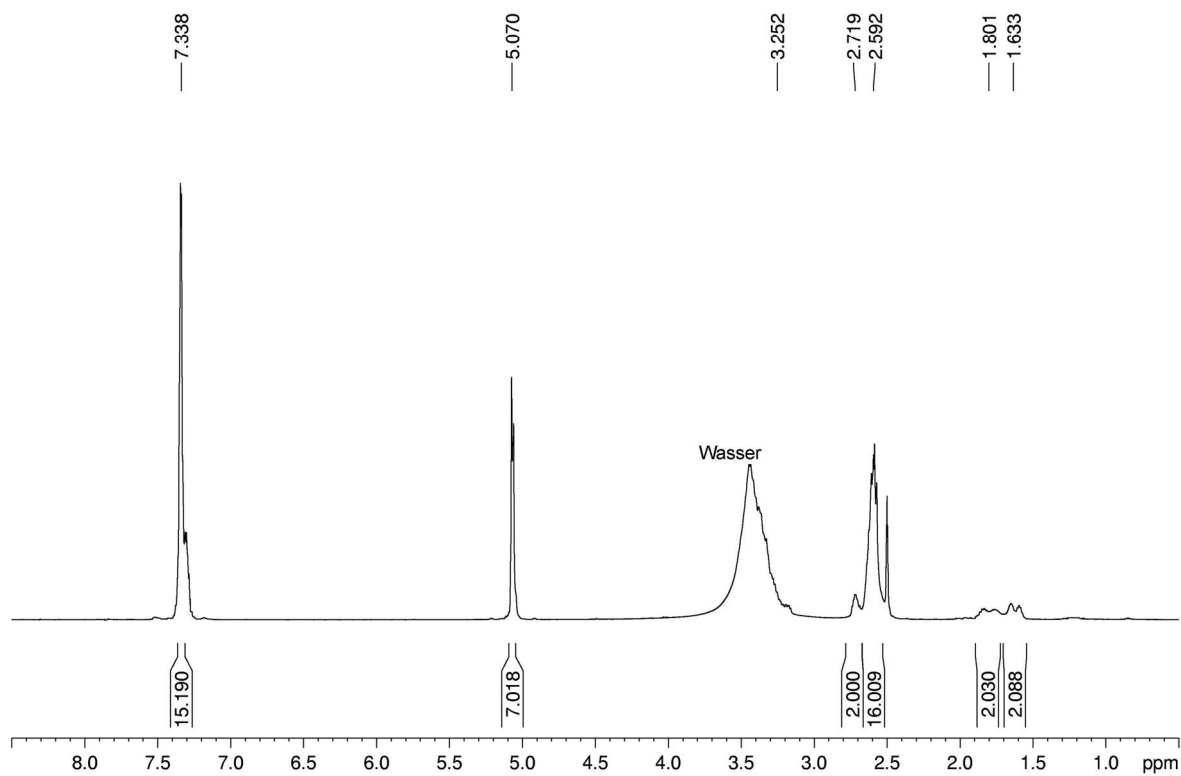
**Abbildung 106:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) von **63**.

### 5.3.6.2. 4-[4,11-Bis-(3-benzyloxycarbonylpropionyl)-1,4,8,11-tetraazacyclo-tetradec-1-yl]-4-oxybutansäurebenzylester **64**<sup>[34]</sup>



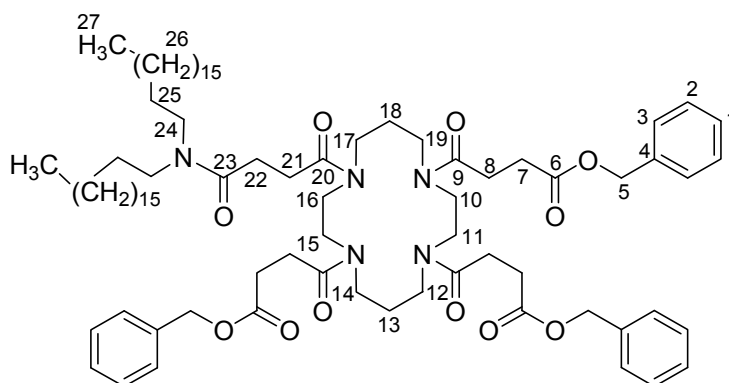
#### Durchführung:

416 mg (2.00 mmol, 3.03 eq.) des Bernsteinsäuremonobenzylesters **63** werden unter Argon in 60 mL abs. DCM gelöst, mit 452 mg (3.50 mmol, 610  $\mu$ L, 5.3 eq.) EDIPA und 834 mg (2.60 mmol, 4.00 eq.) TBTU versetzt und für 10 min. bei RT gerührt, bevor 134 mg (0.66 mmol, 1.00 eq.) des Cyclam zugegeben werden. Anschließend wird die Reaktionsmischung für 18 h unter Argon und bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer bei vermindertem Druck abdestilliert und der erhaltene Rückstand mit 60 mL DCM aufgenommen. Die organische Phase wird dreimal mit jeweils 30 mL ges. NaCl-Lösung gewaschen und danach über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet. Das Lösungsmittel wird abdestilliert und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie über Kieselgel (KG 60, EA/MeOH 5:1) isoliert. Es werden auf diese Weise 364 mg (0.47 mmol) des Produkts **64** als gelbliches Öl erhalten. **Ausbeute:** 71 %;  $R_f$  = 0.23 (EA/MeOH 3:1);  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ , 500 MHz):  $\delta$  [ppm] = 1.63 (m, 2H, H-18); 1.80 (m, 2H, H-13); 2.59 (m, 16H, H-7, H-8, H-17); 2.72 (m, 2H, H-16); 3.25 (m, 12H, H-10, H-11, H-12, H-14, H-15, H-19); 5.07 (m, 7H, H-5, H-16); 7.34 (m, 15H, H-1, H-2, H-3).  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ , 125.7 MHz):  $\delta$  [ppm] = 27.02 (C-12); 27.85 (C-18); 28.96 (C-8); 29.26 (C-7); 44.07-46.81 (C-10, C-11, C-12, C-14, C-15, C-16, C-17, C-19); 65.34 (C-5); 127.78 (C-3); 127.92 (C-1); 128.38 (C-2); 170.48 (C-9); 172.54 (C-6). **HRMS** (ESI pos., MeOH): ber. für  $\text{C}_{43}\text{H}_{55}\text{N}_4\text{O}_9$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  m/z: 771.3964, gef.: m/z: 771.4002; ber. für  $\text{C}_{43}\text{H}_{54}\text{N}_4\text{NaO}_9$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  m/z: 793.3783, gef.: m/z: 793.3820.



**Abbildung 107:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum ( $\text{DMSO-d}_6$ , 500 MHz) von **64**.

**5.3.6.2. 4-[4,8-Bis-(3-benzyloxycarbonylpropionyl)-11-(3-dioctadecylcarbanoylpropionyl)-1,4,8,11-tetraazacyclotetradec-1-yl]-4-oxobutansäurebenzylester **65**<sup>[34]</sup>**

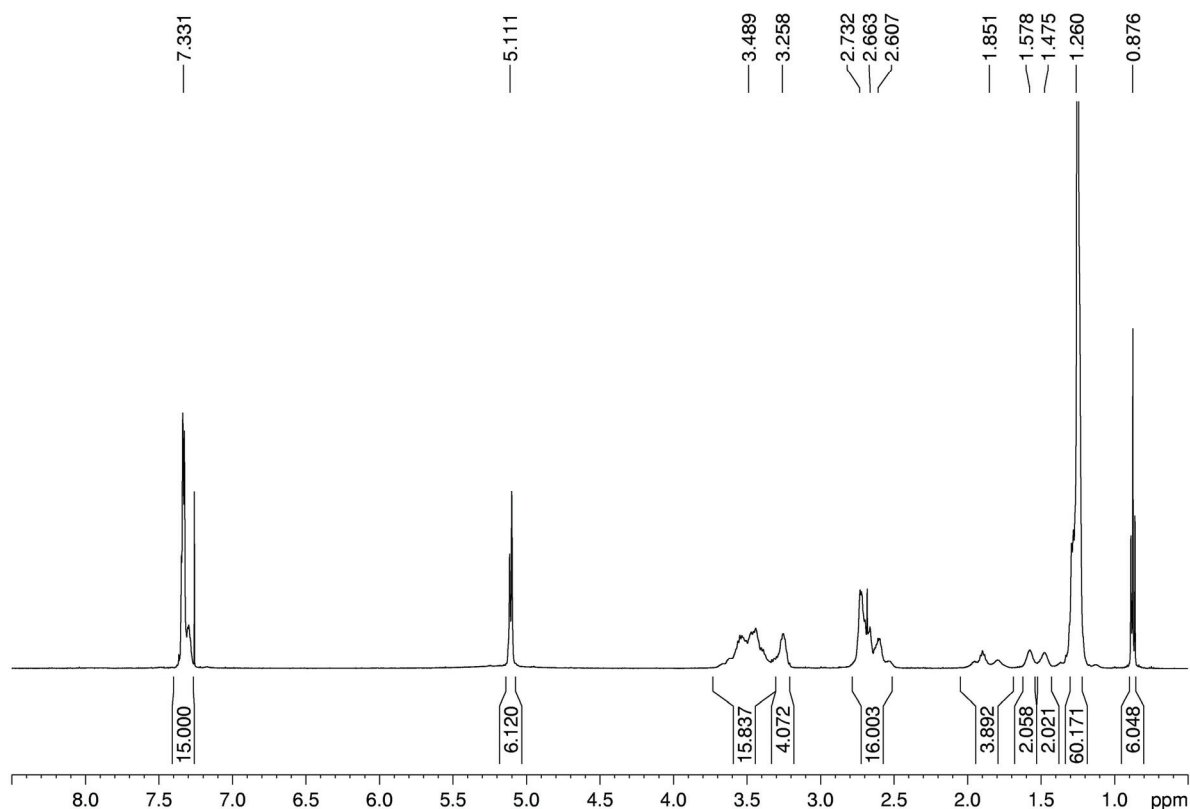


**Durchführung:**

137 mg (0.220 mmol, 1.01 eq.) des *N,N*-Dioctadecylbernsteinsäureamids **29** werden unter Argonatmosphäre in 30 mL abs. DCM gelöst und in der Reihenfolge mit 53 mg (0.412 mmol, 72  $\mu$ L, 1.90 eq.) EDIPA, 98 mg (0.304 mmol, 1.40 eq.) TBTU und 167 mg (0.217 mmol, 1.00 eq.) des dreifachsubstituierten Cyclambausteins **64** versetzt und bei RT unter Argon für 20 h gerührt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer abdestilliert und das erhaltene gelbe Öl erneut mit 30 mL DCM wieder aufgenommen. Die organische Phase wird dreimal mit jeweils 15 mL ges. NaCl-Lösung, einmal mit 10 mL Wasser gewaschen und über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer bei vermindertem Druck wird das Rohprodukt säulenchromatographisch über Kieselgel (KG 60, zwei Säulenvolumina Aceton/Ethylacetat 1:5 Vorlauf, anschließend Ethylacetat/MeOH 3:1) gereinigt. Es werden so 232 mg (0.169 mmol) **65** als gelb-braunes Öl isoliert.

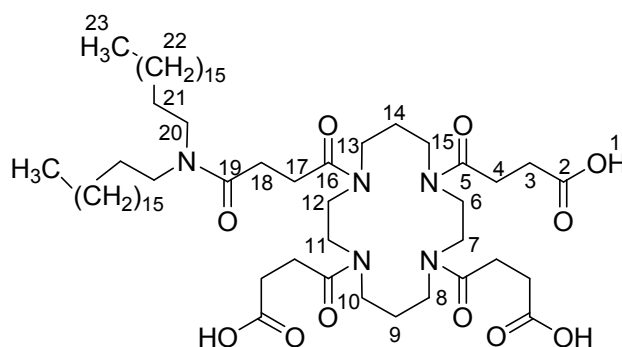
**Ausbeute:** 78 %; **R<sub>f</sub>** = 0.24 (EA/MeOH 3:1); **<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz):  $\delta$  [ppm] = 0.88 (t, <sup>3</sup>J = 7.13 Hz, 6H, H-27); 1.26 (m, 60H, H-26); 1.47 (m, 2H, H-13); 1.58 (m, 2H, H-18); 1.85 (m, 4H, H-25); 2.66 (m, 16H, H-7, H-8; H-21, H-22); 3.26 (m, 4H, H-24); 3.49 (m, 16H, H-10, H-11, H-12, H-14, H-15, H-16, H-17, H-19); 5.11 (m, 6H, H-5); 7.33 (m, 15H, H-1, H-2, H-3). **<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 125.7 MHz):

$\delta$ [ppm] = 14.26 (C-27); 22.82, 27.02, 27.14, 27.45 (C-26); 29.06 (C-13, C-18); 29.50, 29.79, 29.84 (C-7, C-8, C-21, C-22); 29.79, 29.84 (C-27); 32.06 (C-25); 46.99, 47.61, 47.82, 47.93, 48.03, 48.11, 48.24, 48.39 (C-10, C-11, C-13, C-14, C-15, C-16, C-17, C-19); 48.56 (C-24); 66.44, 66.54 (C-5); 128.14, 128.18, 128.21, 128.28, 128.31, 128.60, 128.66 (C-1, C-2, C-3); 136.09, 136.16, 136.21 (C-4); 171.34, 172.08, 172.67, 172.84, 173.03, 173.07, 173.10, 173.99 (C-6, C-9, C-20, C-23). **HRMS** (ESI pos., MeOH): ber. für  $C_{83}H_{132}N_5O_{11}$   $[M+H]^+$  m/z: 1374.9918, gef.: m/z: 1374.9929; ber. für  $C_{83}H_{131}N_5NaO_{11}$   $[M+Na]^+$  m/z: 1396.9737, gef.: m/z: 1396.9777.



**Abbildung 108:**  $^1H$ -NMR-Spektrum ( $CDCl_3$ , 500 MHz) von **65**.

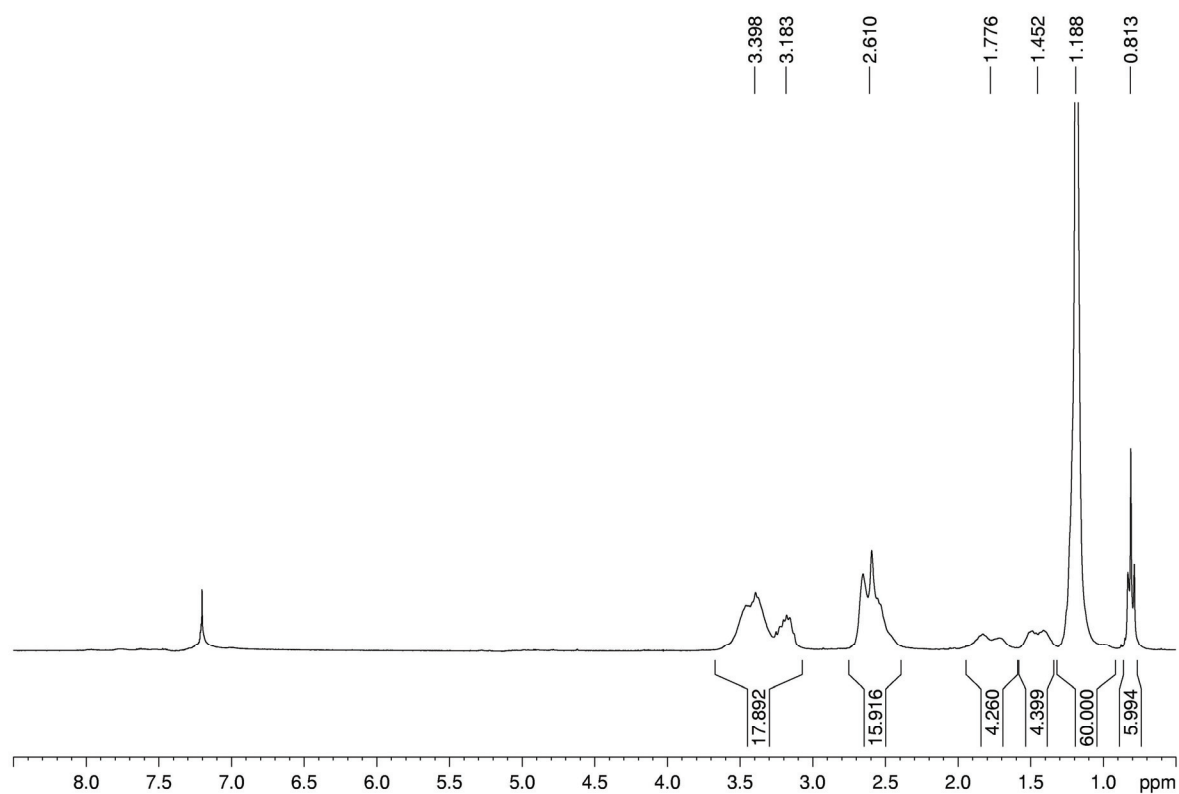
### 5.3.6.3. Synthese von 4-[4,8-Bis-(3-carboxylpropionyl)-11-(3-dioctadecylcarbanoylpropionyl)-1,4,8,11-tetraazacyclotetradec-1-yl]-4-oxobutansäure (Cyclam-Tricarbonsäure) **18**



#### Durchführung:

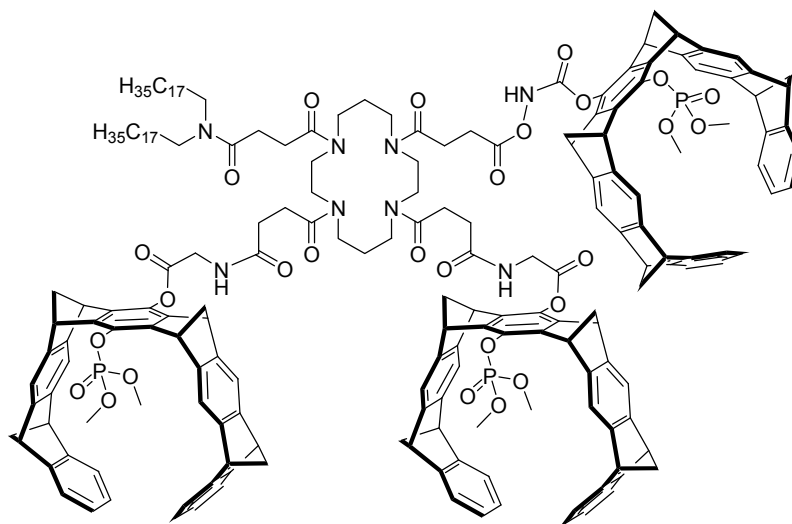
203 mg (0.15 mmol) der benzylgeschützten Cyclam-Tricarbonsäure **65** werden in 15 mL abs. MeOH gelöst und mit 10 mg Pd/C versetzt. Der Reaktionskolben wird einmal kräftig mit Wasserstoff gespült, bevor kurz ein leichter Unterdruck auf das Reaktionsgefäß gezogen und mit Wasserstoff belüftet wird. Dieser Vorgang wird noch zweimal wiederholt. Unter Wasserstoffatmosphäre wird die Reaktionslösung für 48 h unter starkem Rühren auf 40 °C erhitzt. Anschließend wird das Gemisch über eine D4-Fritte über Celite abfiltriert und das Celite dreimal mit jeweils 50 mL MeOH ausgewaschen. Die vereinigten organischen Phasen werden unter Vakuum am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt. Man erhält auf diese Weise 109 mg (0.09 mmol) der Tricarbonsäure **18** als farbloses Öl.

**Ausbeute:** 67 %; **<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz):  $\delta$  [ppm] = 0.81 (t, <sup>3</sup>J = 7.11 Hz, 6H, H-23); 1.19 (m, 60H, H-22); 1.45 (m, 4H, H-9, H-14); 1.58 (m, 4H, H-18); 1.78 (m, 4H, H-21); 2.61 (m, 16H, H-3, H-4; H-17, H-18); 3.18 (m, 4H, H-20); 3.40 (m, 16H, H-6, H-7, H-8, H-10, H-11, H-12, H-13, H-15). **HRMS** (ESI pos., MeOH): ber. für C<sub>62</sub>H<sub>114</sub>N<sub>5</sub>O<sub>11</sub> [M+H]<sup>+</sup> m/z: 1104.8509, gef.: m/z: 1104.8526; ber. für C<sub>62</sub>H<sub>113</sub>N<sub>5</sub>NaO<sub>11</sub> [M+Na]<sup>+</sup> m/z: 1126.8329, gef.: m/z: 1126.8343.



**Abbildung 109:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) von **18**.

#### 5.3.6.4. Versuche zur Synthese des Cyclam-basierten Phosphat-Pinzetten-rezeptors **19**



##### Durchführung 1):

21 mg (0.019 mmol, 1.0 eq.) der Cyclam-Tricarbonsäure **18** werden unter Argon in 7 mL abs. DCM gelöst und auf 0 °C gekühlt. Die Lösung wird mit 9 mg (0.057 mmol, 3.0 eq.) HOBt versetzt und 10 min. gerührt, bevor 12 mg (0.063 mmol, 3.3 eq.) EDCI und 10 mg (0.076 mmol, 14 µL, 4.0 eq.) EDIPA zugegeben werden. Nach 10 min. Rühren bei 0 °C werden 50 mg (0.059 mmol, 3.1 eq.) der Phosphat-Glycin-Ammonium-Trifluoracetat-Pinzette **17** versetzt und auf RT erwärmt. Die Mischung wird 48 h bei RT gerührt.

**Eine Produktbildung konnte nicht beobachtet werden.**



**Durchführung 2):**

21 mg (0.019 mmol, 1.0 eq.) der Cyclam-Tricarbonsäure **18** werden unter Argon in 7 mL abs. DCM und 3 mL abs. DMF gelöst. Die Lösung wird mit 10 mg (0.076 mmol, 14  $\mu$ L, 4.0 eq.) EDIPA versetzt und für 10 min. bei RT gerührt. Dann werden 21 mg (0.063 mmol, 3.3 eq.) TBTU zugegeben und weitere 10 min. gerührt, bevor 50 mg (0.059 mmol, 3.1 eq.) der Phosphat-Glycin-Ammonium-Trifluoracetat-Pinzette **17** zugegeben werden. Die Mischung wird 48 h bei RT gerührt.

**Eine Produktbildung konnte nicht beobachtet werden.**

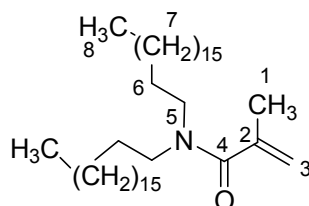
**Durchführung 3):**

21 mg (0.019 mmol, 1.0 eq.) der Cyclam-Tricarbonsäure **18** werden unter Argon in 10 mL abs. DMF gelöst. Die Lösung wird einer Spatelspitze DMAP versetzt und 10 min. gerührt, bevor 12 mg (0.063 mmol, 3.3 eq.) EDCI zugegeben werden. Anschließend werden 50 mg (0.059 mmol, 3.1 eq.) der Phosphat-Glycin-Ammonium-Trifluoracetat-Pinzette **17** zugegeben und die Mischung 48 h bei RT gerührt.

**Eine Produktbildung konnte nicht beobachtet werden.**

### 5.3.7. Synthese der Monomere 68, 73, 75, 2 (Monomer 1 - Monomer 4)

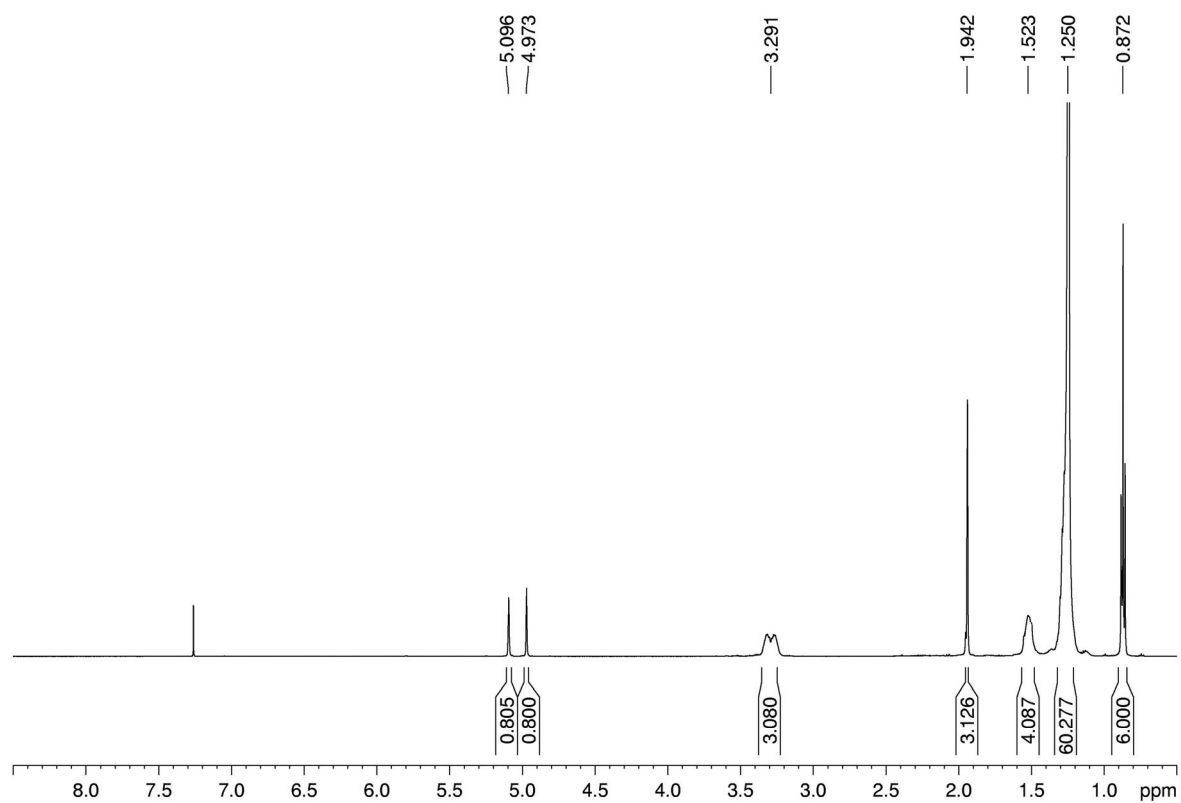
#### 5.3.7.1. *N,N*-Dioctadecylmethacrylsäureamid (Monomer 1) 68



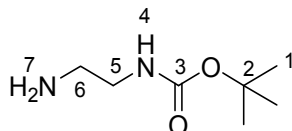
#### Durchführung:

992 mg (1.90 mmol, 1.00 eq.) des *N,N*-Dioctadecylamins **27** werden unter Argon in 30 mL absolutem  $\text{CHCl}_3$  und 1.75 g (17.33 mmol, 2.40 mL, 9.00 eq.) Triethylamin gelöst und bei 0 °C tropfenweise über 2 h mit 300 mg (2.90 mmol, 0.28 mL, 1.50 eq.) Methacrylsäurechlorid **67**, gelöst in 20 mL abs.  $\text{CHCl}_3$ , versetzt. Nach vollendeter Zugabe wird die Reaktionsmischung weitere 2 h bei RT gerührt. Die organische Phase wird fünfmal mit je 30 mL Wasser gewaschen und über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer abdestilliert. Es werden so 1.10 g (1.85 mmol) des Produkts **68** in Form weiß-gelblicher Kristalle erhalten.

**Ausbeute:** 98 %; **Schmp.:** 95 °C;  **$^1\text{H-NMR}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz):  $\delta$ [ppm] = 0.87 (t,  $^3J$  = 6.95 Hz, 6H, H-8); 1.25 (m, 60H, H-7); 1.52 (m, 4H, H-6); 1.94 (s, 3H, H-1); 3.29 (m, 4H, H-5); 4.97 (s, 1H, H-3); 5.10 (s, 1H, H-3).  **$^{13}\text{C-NMR}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 125.7 MHz):  $\delta$ [ppm] = 14.24 (C-8); 20.85 (C-1); 30.00 (C-7, C-6); 32.06 (C-5); 114.41 (C-3); 141.49 (C-2); 172.71 (C-4). **HRMS** (ESI pos., MeOH): ber. für  $\text{C}_{40}\text{H}_{80}\text{NO}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  m/z: 590.6234, gef.: m/z: 590.6256; ber. für  $\text{C}_{40}\text{H}_{79}\text{NNaO}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  m/z: 612.6054, gef.: m/z: 612.6074.



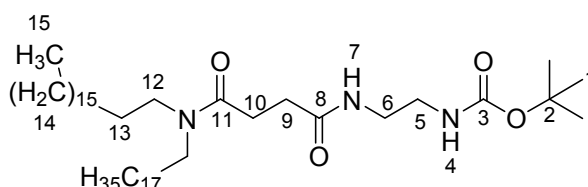
**Abbildung 110:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) von **68**.

**5.3.7.1. *tert*-Butyl-2-aminoethylcarbamate **70****<sup>[241, 242]</sup>**Durchführung:**

10.01 g (167 mmol, 1.00 eq.) des 1,2-Ethyldiamins **69** werden in 100 mL abs.  $\text{CHCl}_3$  unter Argon gelöst und im Eisbad auf 0 °C gekühlt. Die Mischung wird mit 5.03 g (23 mmol, 7.30 eq.) Di-*tert*-butyldicarbonat, gelöst in 40 mL abs.  $\text{CHCl}_3$ , innerhalb von 30 min. versetzt. Die milchig-trübe Reaktionsmischung wird für 12 h bei RT gerührt, bevor das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer bei vermindertem Druck abdestilliert wird. Der erhaltene weiße Feststoff wird mit 100 mL Wasser aufgenommen und der zurückgebliebene Feststoff abfiltriert. Das Filtrat wird dreimal mit jeweils 100 mL DCM extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck abdestilliert und es werden 2.80 g (21.00 mmol) des Produkts **70** als leicht gelbliches Öl isoliert.

**Ausbeute:** 92 %;  **$^1\text{H-NMR}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  [ppm] = 1.19 (s, 2H, H-7); 1.40 (s, 9H, H-1); 2.76 (t,  $^3J = 5.90$  Hz, 2H, H-6); 3.13 (m, 2H, H-5); 5.00 (s, 1H, H-4).

### 5.3.7.2. *tert*.-Butyl-2-(4-(dioctadecylamino)-4-oxobutanamido)-ethylcarbamate **71**



#### Durchführung:

0.311 g (0.5 mmol, 1.0 eq.) DODA-Suc **29** werden unter Argon in 50 mL abs. DCM gelöst und mit 65 mg (0.5 mmol, 1.0 eq.) *tert*.-Butyl-2-aminoethylcarbamate **70**, 0.13 g (1.0 mmol, 0.17 mL, 2.0 eq.) EDIPA und 0.225 g (0.7 mmol, 1.4 eq.) TBTU versetzt. Die Reaktionsmischung wird 18 h bei RT gerührt, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert und der so erhaltene Rückstand mit 70 mL DCM wieder aufgenommen. Die organische Phase wird dreimal mit je 25 mL Wasser gewaschen und über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck abdestilliert und das so erhaltene ölige Rohprodukt säulenchromatographisch über Kieselgel (KG 60, EA/CH 3:1) gereinigt. Es werden auf diese Weise 240 mg (0.300 mmol) des Produkts **71** als beigefarbener Feststoff isoliert.

**Ausbeute:** 63 %; **R<sub>f</sub>** = 0.63 (EA/CH 3:1); **<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz):  $\delta$  [ppm] = 0.83 (t, <sup>3</sup>J = 7.51 Hz, 6H, H-15); 1.21 (m, 60H, H-14); 1.39 (s, 9H, H-1); 1.44 (m, 2H, H-13a); 1.51 (m, 2H, H-13b); 2.47 (t, <sup>3</sup>J = 6.67 Hz, 2H, H-9); 2.62 (t, <sup>3</sup>J = 6.67 Hz, 2H, H-10); 3.22 (m, 8H, H-5, H-6, H-12); 5.34 (m, 1H, H-4); 6.89 (m, 1H, H-7). **<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 125.7 MHz):  $\delta$  [ppm] = 14.15 (C-15); 22.73, 27.00, 27.14, 27.87, 28.46 (C-12, C-13, C-14); 29.41 (C-1); 29.50, 29.62, 29.67, 29.72, 29.76 (C-14); 40.10 (C-9); 40.44 (C-10); 46.32 (C-5); 48.07 (C-6); 79.15 (C-2); 156.46 (C-3); 171.47, 173.42 (C-8, C-11). **HRMS** (ESI pos., MeOH): ber. für C<sub>47</sub>H<sub>94</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup> m/z: 764.7239, gef.: m/z: 764.7279; ber. für C<sub>47</sub>H<sub>93</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>4</sub> [M+Na]<sup>+</sup> m/z: 786.7058, gef.: m/z: 786.7111.

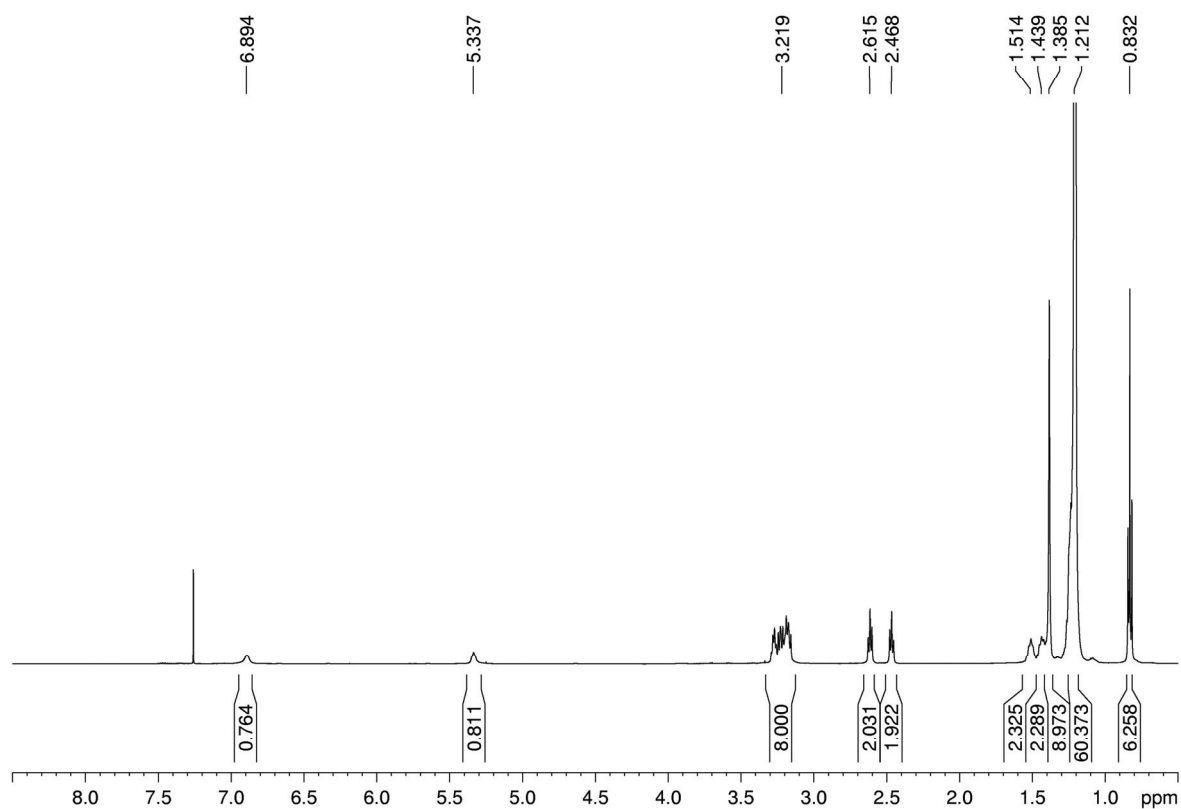
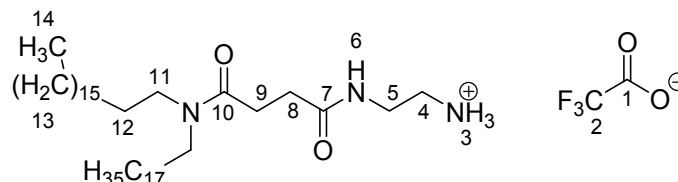
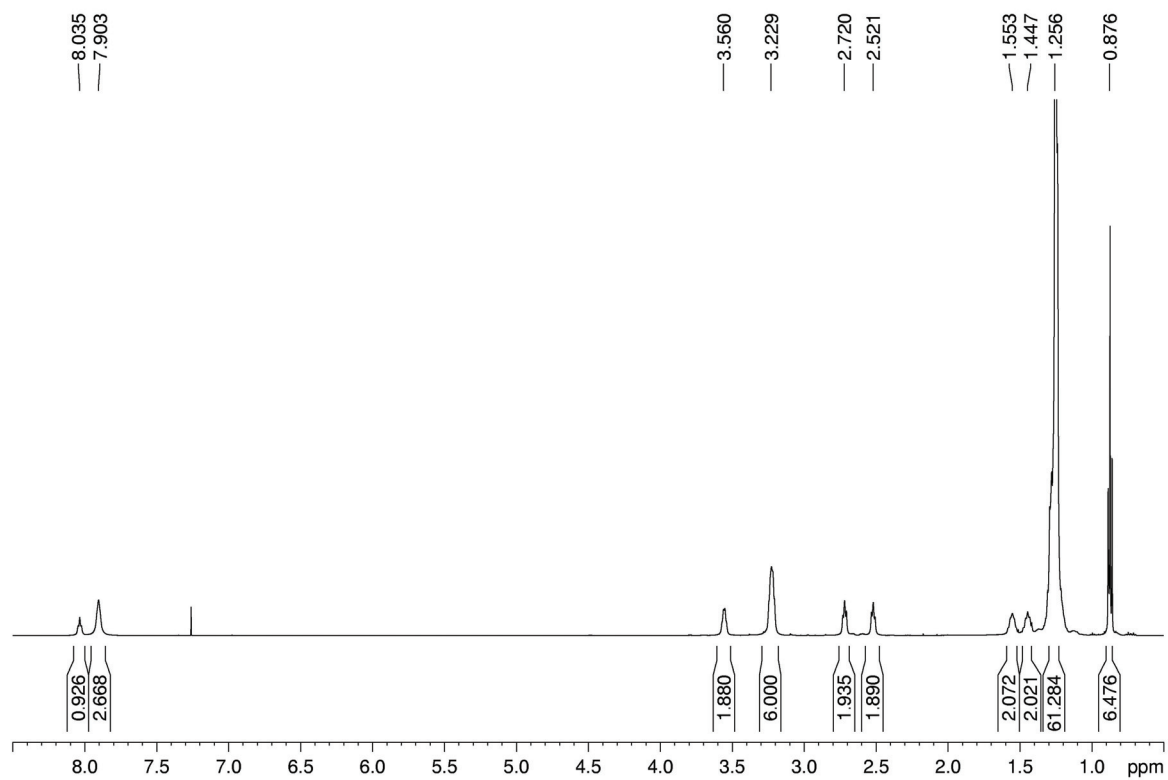


Abbildung 111:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) von 71.

**5.3.7.3. 2-(4-(Diocetadecylamino)-4-oxobutanamido)ethylammonium****Trifluoracetatsalz 72****Durchführung:**

210 mg (0.270 mmol) **71** werden unter Argon in 14 mL abs. DCM gelöst und bei RT mit 7 mL TFA versetzt. Die Reaktionsmischung wird für 4 h bei RT gerührt und die Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Der erhaltene ölige Rückstand wird mit 5 mL abs. DCM und 5 mL abs. Benzen aufgenommen und erneut bis zur Trockene eingengt. Dieser Vorgang wird fünf weitere Male wiederholt. Auf diese Weise werden 214 mg (0.270 mmol) des Trifluoracetatsalzes **72** in Form eines gelblichen Öls erhalten.

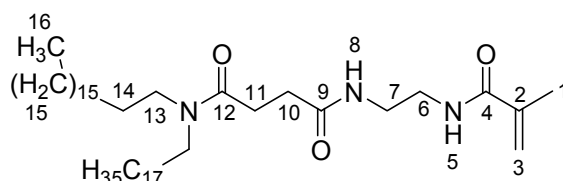
**Ausbeute:** 99 %; **<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz):  $\delta$  [ppm] = 0.88 (t,  $^3J$  = 7.53 Hz, 6H, H-14); 1.26 (m, 60H, H-13); 1.45 (m, 2H, H-12a); 1.55 (m, 2H, H-12b); 2.52 (t,  $^3J$  = 5.92 Hz, 2H, H-8); 2.72 (t,  $^3J$  = 5.92 Hz, 2H, H-9); 3.23 (m, 6H, H-4, H-11); 3.56 (m, 2H, H-5); 7.90 (m, 3H, H-3); 8.04 (t, 1H, H-6). **<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 125.7 MHz):  $\delta$  [ppm] = 14.24 (C-14); 22.85, 27.03, 27.10, 27.66, 28.54, 28.76, 29.40, 29.49, 29.53, 29.57, 29.69, 29.72, 29.79, 29.85 (C-11, C-12, C-13); 37.51 (C-4); 39.89 (C-5); 47.04 (C-8); 48.79 (C-9); 115.65 (C-1); 161.04 (C-2); 172.51, 176.08 (C-7, C-10). **HRMS** (ESI pos., MeOH): ber. für C<sub>42</sub>H<sub>86</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> m/z: 664.6715, gef.: m/z: 664.6763.



**Abbildung 112:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) von 72.



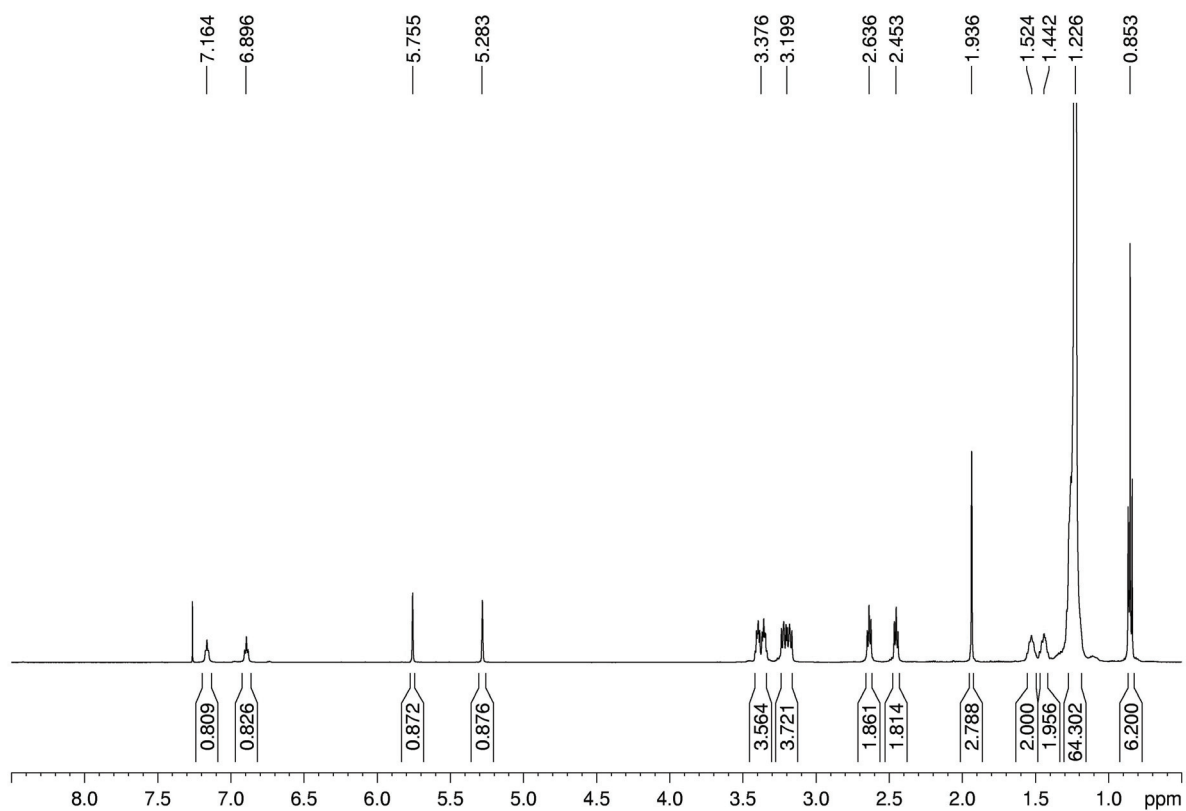
#### 5.3.7.4. *N*<sup>1</sup>,*N*<sup>1</sup>-Dioctadecyl-*N*<sup>4</sup>-2-methacrylamidoethylbernsteinsäureamid (Monomer 2) 73



##### Durchführung:

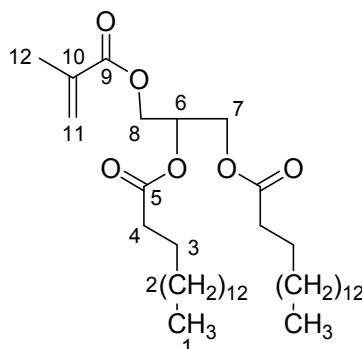
1.40 g (1.80 mmol, 1.0 eq.) **72** werden unter Argon in 30 mL abs. CHCl<sub>3</sub> gelöst, mit 1.75 g (17.3 mmol, 2.4 mL, 9.6 eq.) Triethylamin versetzt und auf 0 °C gekühlt. Es wird eine Lösung von 260 mg (2.50 mmol, 240 µL, 1.4 eq.) Methacrylsäurechlorid **67**, gelöst in 20 mL abs. CHCl<sub>3</sub>, über einen Zeitraum von 2 h zugetropft. Nach vollendeter Zugabe wird die Mischung weitere 2 h bei RT gerührt. Die organische Phase wird fünfmal mit jeweils 30 mL Wasser gewaschen und über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer bei vermindertem Druck abdestilliert. Es werden auf diese Weise 720 mg (0.98 mmol) des Monomers **73** als gelbes Öl erhalten.

**Ausbeute:** 54 %; **<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz):  $\delta$  [ppm] = 0.85 (t, <sup>3</sup>J = 7.18 Hz, 6H, H-16); 1.23 (m, 60H, H-15); 1.44 (m, 2H, H-13a); 1.52 (m, 2H, H-13b); 1.94 (s, 3H, H-1); 2.45 (t, <sup>3</sup>J = 6.38 Hz, 2H, H-6); 2.62 (t, <sup>3</sup>J = 6.38 Hz, 2H, H-7); 3.20 (m, 4H, H-13); 3.38 (m, 4H, H-10, H-11); 5.28 (s, 1H, H-3a); 5.76 (s, 1H, H-3b); 6.90 (m, 1H, H-8); 7.16 (m, 1H, H-5). **<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 125.7 MHz):  $\delta$  [ppm] = 14.18 (C-16); 18.73 (C-1); 22.78, 27.03, 27.21, 27.91, 28.95, 29.02, 29.45, 29.54, 29.66, 29.71, 29.75, 29.80 (C-13, C-14, C-15); 39.50 (C-6); 40.41 (C-7); 46.42 (C-10); 48.10 (C-11); 119.83 (C-3); 139.82 (C-2); 168.78 (C-4); 171.44, 174.39 (C-9, C-12). **HRMS** (ESI pos., MeOH): ber. für C<sub>46</sub>H<sub>90</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup> m/z: 732.6977, gef.: m/z: 732.6973; ber. für C<sub>46</sub>H<sub>89</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>3</sub> [M+Na]<sup>+</sup> m/z: 754.6769, gef.: m/z: 754.6799.



**Abbildung 113:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) von **73**.

#### 5.3.7.4. 3-(Methacryloyloxy)propan-1,2-dioldipalmitat (Monomer 3) 75

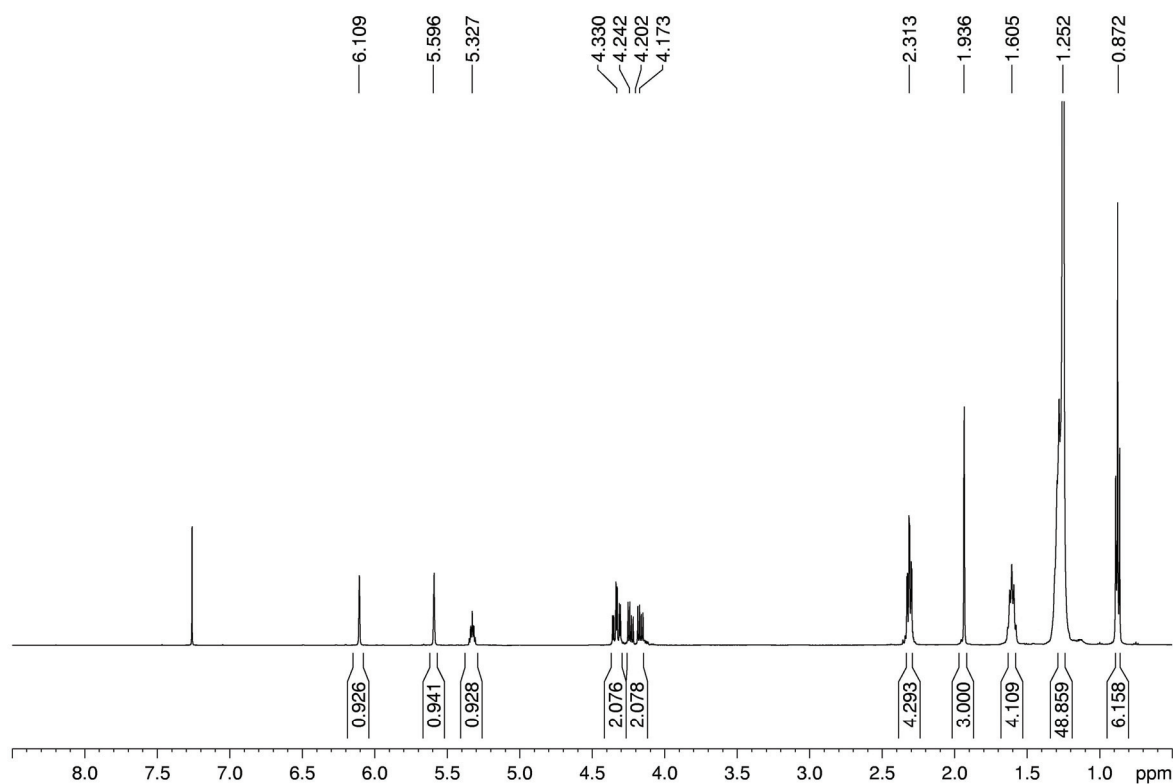


#### Durchführung:

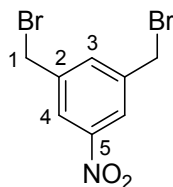
0.9 g (1.584 mmol, 1.0 eq.) 3-Hydroxypropan-1,2-dioldipalmitat (1,2 Dipalmitoylglycerol) **74** werden unter Argon in 20 mL abs.  $\text{CHCl}_3$  gelöst, mit 1.44 g (14.22 mmol, 2.0 mL, 9 eq.)  $\text{NEt}_3$  versetzt und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wird innerhalb von 30 min. eine Lösung aus 248 mg (2.376 mmol, 232  $\mu\text{L}$ , 1.5 eq.) Methacrylsäurechlorid **67**, gelöst in 10 mL abs.  $\text{CHCl}_3$ , zugetropft. Nach vollendeter Zugabe wird die Mischung noch weitere 90 min. bei 0 °C gerührt, bevor die Reaktionsmischung auf RT erwärmt und weitere 2 h bei RT gerührt wird. Die organische Phase wird dreimal mit jeweils 40 mL Wasser, einmal mit 15 mL 1 M HCl, einmal mit 15 mL ges.  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung und abschließend mit 20 mL Wasser gewaschen und über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck abdestilliert. Man erhält auf diese Weise 870 mg (1.367 mmol) des Monomers **75** als farbloses Öl.

**Ausbeute:** 86 %;  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz):  $\delta$  [ppm] = 0.87 (t,  $^3J = 7.37$  Hz, 6H, H-1); 1.25 (m, 48H, H-2); 1.60 (m, 4H, H-3); 1.94 (m, 3H, H-12); 2.31 (m, 4H, H-4); 4.20 (m, 2H, H-7); 4.33 (m, 2H, H-8); 5.33 (m, 1H, H-6); 5.60 (m, 1H, H-11a); 6.11 (m, 1H, H-11b).  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125.7 MHz):  $\delta$  [ppm] = 14.25 (C-1); 18.39 (C-12); 22.83, 25.02, 25.06, 29.41, 29.51, 29.77, 29.81, 29.85, 32.07 (C-2, C-3); 34.20, 34.38 (C-4); 62.27 (C-7); 62.75 (C-8); 69.00 (C-6); 126.44 (C-11); 135.86 (C-10);

166.90 (C-9); 173.02, 173.45 (C-5). **HRMS** (ESI pos., MeOH): ber. für  $C_{39}H_{72}NaO_6$   $[M+Na]^+$  m/z: 659.5221, gef.: m/z: 659.5272.



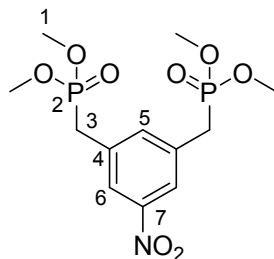
**Abbildung 114:**  $^1H$ -NMR-Spektrum ( $CDCl_3$ , 500 MHz) von **75**.

**5.3.7.4. Darstellung von 3,5-Bis-(brommethyl)-5-nitrobenzen **77**<sup>[16]</sup>****Durchführung:**

5.0 g (33.0 mmol, 1 eq.) 3,5-Dimethylnitrobenzen (5-Nitro-*m*-Xylen) **76** werden in 150 mL Tetrachlorkohlenstoff gelöst, mit 12.3 g (69.0 mmol, 2.1 eq.) NBS versetzt und zum Sieden erhitzt. Es wird eine Spatelspitze AIBN zugegeben und die Reaktionsmischung für 7 h unter Rückfluss gekocht. Das abgeschiedene Succinimid wird abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Der erhaltene braune Feststoff wird ohne Aufreinigung weiter umgesetzt. Es werden 10.3 g Rohprodukt von **77** erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz):  $\delta$  [ppm] = 4.51 (s, 4H, H-1); 7.74 (m, 1H, H-3); 8.21 (m, 2H, H-4).

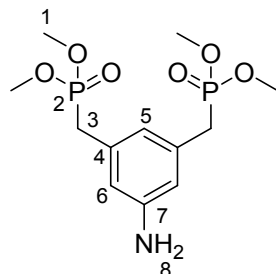
#### 5.3.7.4. Darstellung von 3,5-Bis-(dimethoxyphosphorylmethyl)nitrobenzen **78**<sup>[16]</sup>



#### Durchführung:

10.3 g des 3,5-Bis(brommethyl)-5-nitrobenzen Rohprodukts **77** werden mit 12.7 g (100.0 mmol, 12 mL) Trimethylphosphit versetzt und für 5 h unter Rückfluss erhitzt. Das überschüssige Trimethylphosphit wird abkondensiert und der erhaltene dunkelbraune, ölige Rückstand säulenchromatographisch über Kieselgel (KG 60, DCM/MeOH 16:1) aufgereinigt. Es werden so 4.2 g (11.6 mmol) des Produkts **78** als gelblicher Feststoff erhalten.

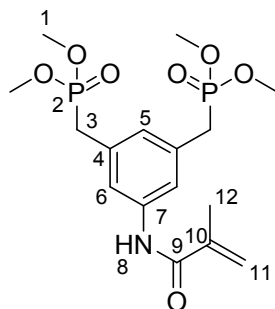
**Ausbeute:** 35 % über 2 Stufen;  $R_f = 0.25$  (DCM/MeOH 16:1); **<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz):  $\delta$  [ppm] = 3.26 (d,  $^2J_{H,P} = 21.7$  Hz, 4H, H-3); 3.73 (d,  $^3J_{H,P} = 11.7$  Hz, 12H, H-1); 7.60 (m, 1H, H-5); 8.00 (m, 2H, H-6). **<sup>31</sup>P-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 120 MHz):  $\delta$  [ppm] = 27.25 (P-2).

**5.3.7.4. Darstellung von 3,5-Bis(dimethoxyphosphorylmethyl)anilin **78**<sup>[16]</sup>****Durchführung:**

1.0 g (2.72 mmol, 1.0 eq.) des 3,5-Bis(dimethoxyphosphorylmethyl)-5-nitrobenzens **78** werden in 100 mL MeOH gelöst und mit 0.5 g Pd/C versetzt. Der Reaktionskolben wird dreimal mit H<sub>2</sub> gespült, bevor die Mischung bei RT unter Wasserstoffatmosphäre für 24 h stark gerührt wird. Die Suspension wird über Celite filtriert und dreimal mit jeweils 50 mL MeOH nachgewaschen. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck abdestilliert und es werden 779 mg (2.31 mmol) des Anilins **79** als gelbliches Öl erhalten.

**Ausbeute:** 85 %; **<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz):  $\delta$  [ppm] = 3.05 (d,  $^2J_{H,P}$  = 21.6 Hz, 4H, H-3); 3.11 (s, 2H, H-8); 3.67 (d,  $^3J_{H,P}$  = 12.2 Hz, 12H, H-1); 6.55 (m, 2H, H-6); 6.60 (m, 1H, H-5). **<sup>31</sup>P-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 120 MHz):  $\delta$  [ppm] = 28.95 (P-2).

#### 5.3.7.4. Darstellung des BP-Rezeptormonomers *N*-[3,5-Bis(dimethoxyphosphoryl-methyl)phenyl]methacrylsäureamid (Monomer 4) **2**<sup>[16]</sup>



#### **Durchführung:**

779 mg (2.31 mmol, 1.0 eq.) des Anilins **79** werden unter Argon in 30 mL abs. DCM gelöst und mit einer katalytischen Menge DMAP, 280 mg (2.77 mmol, 386  $\mu$ L, 1.2 eq.)  $\text{NEt}_3$  versetzt und auf 0 °C gekühlt. Innerhalb von 1 h wird eine Lösung von 362 mg (3.47 mmol, 338  $\mu$ L, 1.5 eq.) Methacrylsäurechlorid **67** in 10 mL abs. DCM zugetropft. Nach vollendeter Zugabe wird die Mischung auf RT erwärmt und eine weitere Stunde bei RT gerührt. Die organische Phase wird mit 30 mL 0.6 M NaOH gewaschen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck abdestilliert. Das erhaltene Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie über Kieselgel (KG 60, DCM/MeOH 19:1) gereinigt. Es können 749 mg (1.85 mmol) des BP-Monomers **2** als farbloses, viskoses Öl isoliert werden.

**Ausbeute:** 80 %;  $R_f$  = 0.24 (DCM/MeOH 19:1);  **$^1\text{H-NMR}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  [ppm] = 2.05 (m, 3H, H-12); 3.14 (d,  $^2J_{\text{H,P}}$  = 22.2 Hz, 4H, H-3); 3.70 (d,  $^3J_{\text{H,P}}$  = 10.7 Hz, 12H, H-1); 5.45 (m, 1H, H-11a); 6.97 (m, 1H, H-11b); 7.45 (m, 2H, H-6); 7.70 (m, 1H, H-5).  **$^{31}\text{P-NMR}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 120 MHz):  $\delta$  [ppm] = 28.15 (P-2).



### 5.3.8. Polymerisationsversuche mit den Monomeren 68, 73, 75 und 2

Die Polymerisationen sollen alle nach dem gleichen Protokoll durchgeführt werden. Die Ansatzgrößen und Zusammensetzungen sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Die einzelnen Monomere werden in 3-4 mL abs. DMF gelöst und entgast, indem sie in flüssigem Stickstoff eingefroren werden und unter Vakuum entgast werden. Die Lösungen werden langsam auf RT erwärmt und abermals eingefroren. Dieser Vorgang wird noch zweimal wiederholt, bevor die Reaktionskolben mit Argon belüftet werden. Die Reaktionsmischungen werden unter Argon auf 60 °C erhitzt und mit AIBN als Radikalstarter versetzt. Anschließend wird bei 60 °C für 16 h gerührt. Die Reaktionsgemische werden durch Zugabe von 5 % abs. Methanol, bezogen auf die Masse der Monomere, gequenchet. Sollten Polymere entstanden sein, sollten sie durch Eintropfen in das 10-fache des Reaktionsvolumens Ethylacetat ausgefällt werden.

Nur die Ansätze **P3** und **P9** lieferten Bisphosphonat-Rezeptor-Homopolymer. Sobald lipidische Monomere in der Reaktionsmischung vorlagen war keine Polymerisation zu erreichen. Auch eine Bestrahlung mit UV-Licht konnte die Polymerisation nicht in Gang bringen.

**Tabelle 8:** Polymerisationsansätze

	Monomer 4 2	Monomer 1 68	Monomer 2 73	Monomer 3 75	AIBN
<b>P1</b>	470 mg (1.16 mmol)		85 mg (0.12 mmol)		21 mg (0.13 mmol)
<b>P2</b>	600 mg (1.48 mmol)	87 mg (0.15 mmol)			26 mg (0.16 mmol)
<b>P3</b>	250 mg (0.62 mmol)				5 mg (0.031 mmol)
<b>P4</b>			100 mg (0.14 mmol)		1 mg (0.01 mmol)
<b>P5</b>		160 mg (0.27 mmol)			2 mg (0.01 mmol)
<b>P6</b>	521 mg (1.30 mmol)		95 mg (0.13 mmol)		2 mg (0.01 mmol)
<b>P7</b>	441 mg (1.10 mmol)	65 mg (0.11 mmol)			2 mg (0.01 mmol)
<b>P8</b>	400 mg (0.98 mmol)	12 mg (0.02 mmol)			1 mg (0.01 mmol)
<b>P9</b>	353 mg (0.87 mmol)				6 mg (0.04 mmol)
<b>P10</b>	486 mg (1.20 mmol)	35 mg (0.06 mmol)			12 mg (0.05 mmol)
<b>P11</b>	220 mg (0.54 mmol)			22 mg (0.03 mmol)	1 mg (0.01 mmol)
<b>P12</b>	160 mg (0.40 mmol)			16 mg (0.03 mmol)	1 mg (0.01 mmol)
<b>P13</b>				50 mg (0.09 mmol)	1 mg (0.01 mmol)

## 5.4. Filmwaage-Messungen

In den Langmuirtrog (Oberflächengröße: 700 mm × 100 mm) der Filmwaage werden 400 mL des HEPES-Puffers (20 mM, pH = 7.5) mit den darin gelösten Proteinen oder Peptiden gegeben. Die Proteinkonzentrationen liegen dabei zwischen 0.2 und 200 nM und die Peptidkonzentrationen bei 500 nM. Der Puffer wird mit bidest. Wasser (gereinigt mittels: ELGA Purelab UHQ, > 18 MΩcm) angesetzt. Die Subphase wird durch mehrmaliges Öffnen und Schließen der Barriere mit einer Barrierengeschwindigkeit von 50 cm<sup>2</sup>/min auf eine fehlende Oberflächenaktivität überprüft. Die Oberflächenspannung wird mittels eines *Wilhelmy*-Systems gemessen. Die Lipidmonoschicht aus Stearinsäure (SAM) wird durch Spreiten von 25 µL einer 3.5 mM Stearinsäurelösung (in Chloroform) auf die jeweilige wässrige Subphase erhalten. Nach ca. 10 min. wird die Lipidmonoschicht einige Male durch Öffnen und Schließen der Barrieren komprimiert und wieder entspannt. Dann werden jeweils 0.1 eq. des Rezeptors **11** (5 µL als 1.75 mM Lösung in Chloroform/Methanol 3:1) vorsichtig auf die Stearinsäuremonoschicht gegeben. Zum besseren Einlagern des Rezeptors **11** in die Monolage wird 30 min. gewartet und anschließend die Monolage dreimal komprimiert und entspannt (Barrierengeschwindigkeit 50 cm<sup>2</sup>/min). Der Oberflächendruck  $\pi$  wird als Funktion der Fläche A in Druck-Flächen-Isothermen gemessen. Es werden maximal 0.3 eq. des Rezeptorlipids **11** in die Monoschicht aus Stearinsäure eingelagert. Alle Messungen werden bei 25 °C durchgeführt.

Für Titrations mit Proteinen wurde die Subphase jeweils neu mit der entsprechenden Proteinkonzentration angesetzt, da bei der Größe des Langmuirtroges nur so eine gleichmäßige Vermischung möglich ist. Für jede Messung wurde entsprechend eine neue Stearinsäuremonoschicht erstellt und das Rezeptorlipid **11** eingelagert.

Die experimentellen Ergebnisse sind im Durchführungsteil gezeigt. Um die Reproduzierbarkeit der gemessenen Daten zu überprüfen, wurden alle Messungen mindestens dreimal wiederholt.

## 5.5. RfS-Messungen

Die RfS-Messungen wurden für jedes einzelne Protein nach dem gleichen Protokoll durchgeführt. Alle Messungen wurden bei 25 °C durchgeführt. Als Laufpuffer wurde 20 mM HEPES-Puffer mit 150 mM NaCl, pH = 7.5 benutzt.

Zuerst wurde der, wie in Abschnitt 5.2 beschrieben, gereinigte Glaschip in das Gerät eingelegt und mit Puffer für 10-30 min. so lange gespült, bis eine stabile Grundlinie erhalten wurde. Anschließend wurde die Lipiddoppelschicht mittels Vesikelfusion aufgebracht. Dazu wurde die Liposomenlösung, wie in Abschnitt 5.2 beschrieben, hergestellt. 150 µL der Liposomenlösung wurden mit 50 µL HEPES-Puffer und 50 µL 5 M NaCl-Lösung in Puffer in ein Well pipettiert und nach folgendem Protokoll zur Fusion gebracht:

<b>Flussrate</b>	<b>Volumen</b>	<b>Zeit</b>	<b>Lösung</b>
10 µL/min.	20 µL	2 min.	Puffer
10 µL/min.	220 µL	22 min.	Liposomen
10µL/min.	500 µL	50 min.	Puffer

Die anschließende Titration mit dem jeweiligen Protein wurde nach ähnlichem Schema durchgeführt:

<b>Flussrate</b>	<b>Volumen</b>	<b>Zeit</b>	<b>Lösung</b>
10 µL/min.	20 µL	2 min.	Puffer
10 µL/min.	190 µL	19 min.	Proteinlösung
10µL/min.	500 µL	50 min.	Puffer

Dabei wurden Proteinkonzentration von 3 nM bis 1 µM gewählt und diese nacheinander über die mit Lipidrezeptoren dotierte Lipiddoppelschicht gespült. Es wurde mit der höchsten Proteinkonzentration (1 µM) begonnen, um irreversible Bindungsstellen zu besetzen. Anschließend folgten die anderen Proteinkonzentrationen, beginnend bei der Niedrigsten von 3 nM und dann aufsteigend 10 nM, 30 nM, 70 nM, 100 nM, 300 nM, 500 nM und 700 nM bis 1 µM. Die einzelnen Protein- oder Peptidlösungen wurden angesetzt, indem zuerst eine Stammlösung

hergestellt wurde, indem die Proteine oder Peptide als Feststoff eingewogen und mit HEPES-Puffer (20 mM, 150 mM NaCl, pH = 7.5) aufgenommen wurden. Zur Messung wurden die einzelnen Konzentrationen in einer Verdünnungsreihe angesetzt und zur Messung gebracht. Die Änderung der optischen Schichtdicke wurde beobachtet. Der benutzte Puffer wurde durch Vakuumziehen auf 70 mbar für ein bis zwei Stunden und anschließendes Sterilfiltrieren entgast. Für die meisten bindenden Proteine wurde neben der reversiblen Bindung stets auch ein meist nicht zu vernachlässigender irreversibler Bindungsanteil gefunden. Daher ist es nicht möglich exakte Bindungskonstanten auf der Oberfläche zu bestimmen. Es wurde versucht aus den reversiblen Bindungsanteilen der Bindungskurven unter Vorbehalt eine Bindungskonstante abzuschätzen, wenn die auf unterschiedlichen Auswertungsmöglichkeiten erhaltenen Werte Bindungskonstanten in der gleichen Größenordnung lieferten. Als Auswertungsmöglichkeiten wurden dabei herangezogen: Fitten mit dem Langmuir Bindungsmodell (1:1 Bindung), Fitten der Bindungskurve mit dem Software-Programm *BiaEvaluation* (Langmuir Modell 1:1), Scatchard-Plots und nichtlineare Regressionsmethoden.

Aus dem irreversiblen Bindungsteil konnten die Dissoziationsratenkonstanten durch fitten des Dissoziationsvorganges mit einem biexponentiellen Dissoziationsmodell mit dem Programm *BiaEvaluation* abgeschätzt werden.

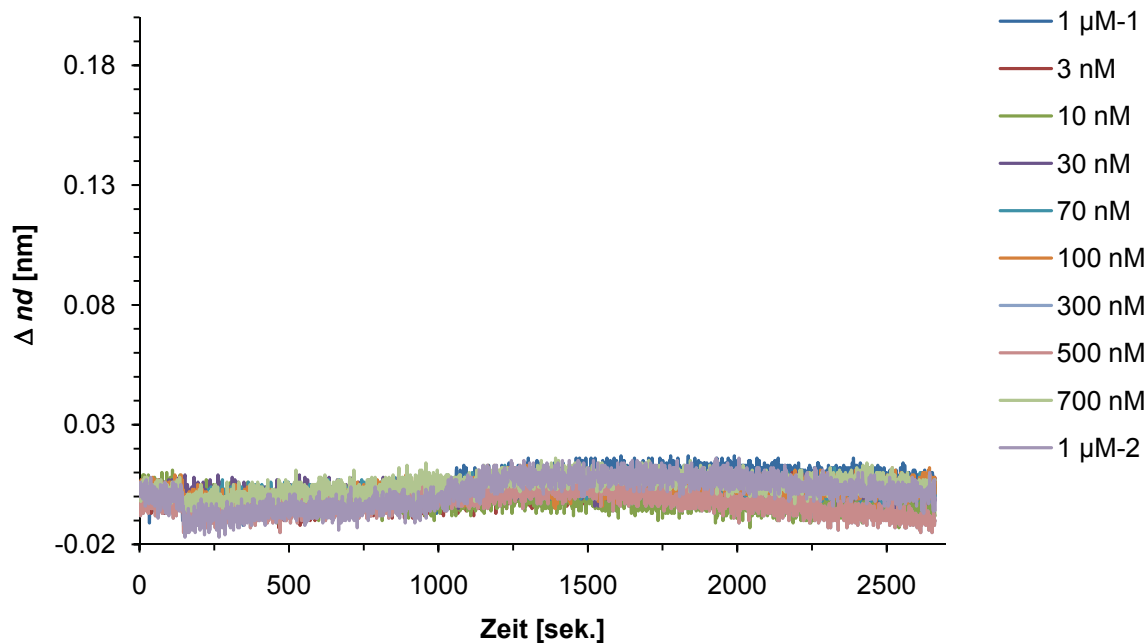
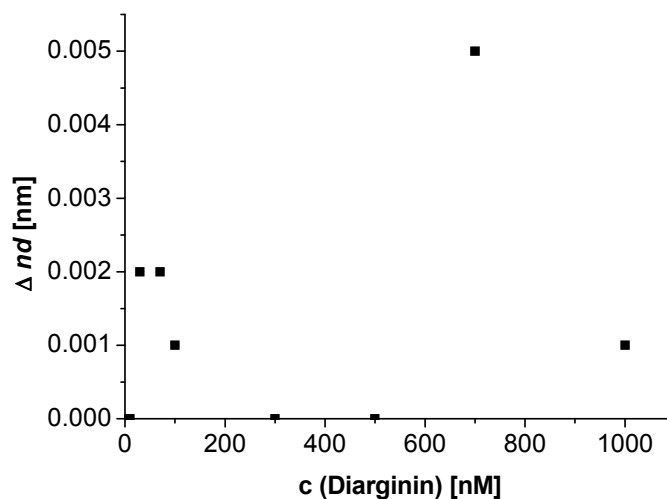
Um die Reproduzierbarkeit der gemessenen Daten zu überprüfen wurden die Messungen dreimal wiederholt. Zu jedem Protein und Peptid wurde eine Blindprobe auf einer undotierten Lipiddoppelschicht, bestehend aus reinem SOPC, gemessen. Für die alle Peptide und meisten Proteine wurde dabei keine Bindung zur undotierten Oberfläche gemessen. Eine Ausnahme bildet das Casein, wo auch mit der undotierten Lipiddoppelschicht eine gewisse Wechselwirkung beobachtet wurde. Diese Blindproben sind, wenn sie Effekte zeigten, bei der jeweiligen Messung mit abgebildet.

Die Messungen auf den mit DNA-dotierten Lipidoberflächen wurden ebenfalls nach dem oben beschriebenen Protokoll durchgeführt. Die Ergebnisse der Messungen sind im Kapitel Durchführung und Ergebnisse gezeigt

## Peptide

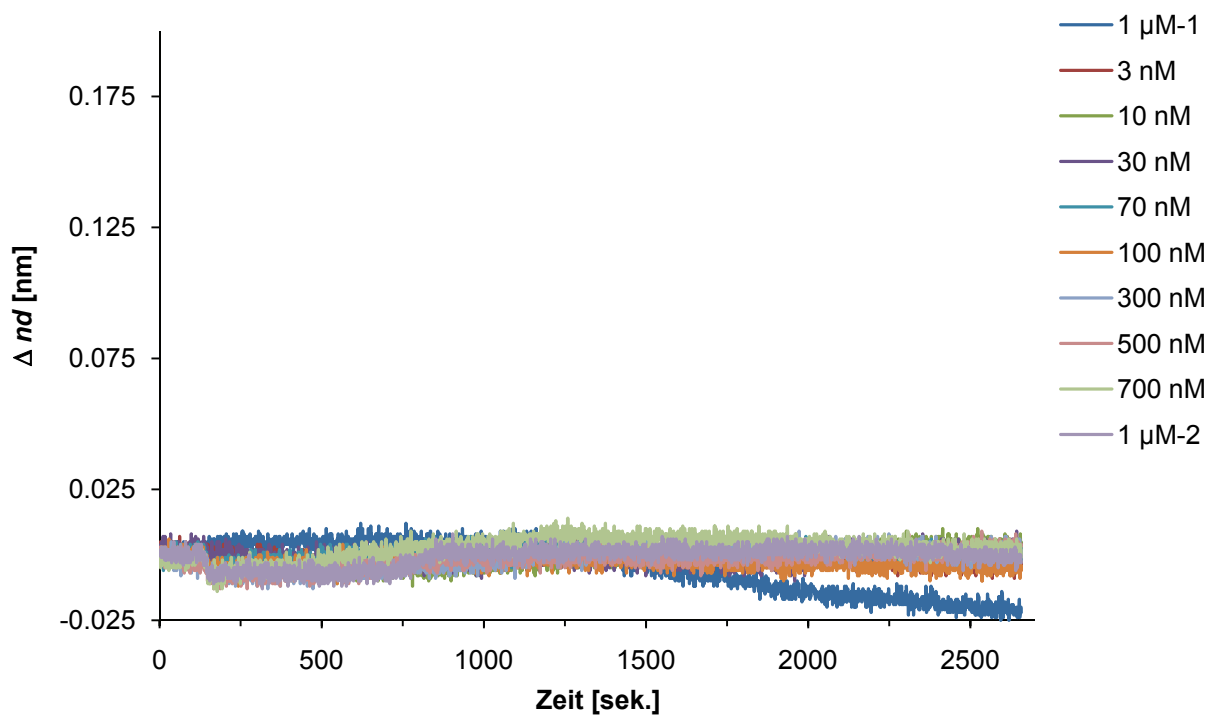
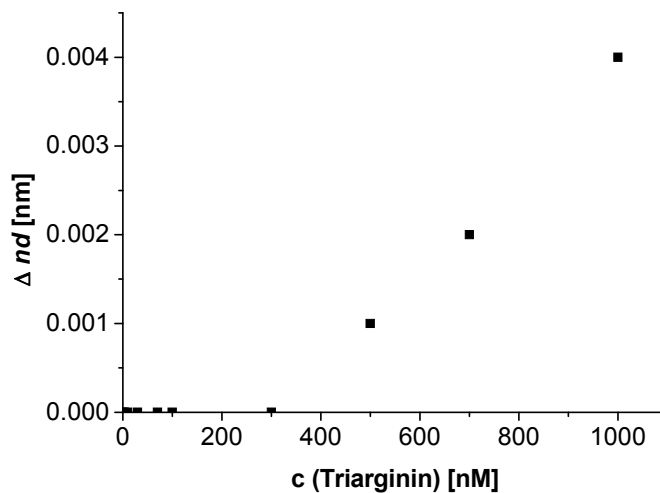
**Diarginin Arg<sub>2</sub>** (0.3 kDa, pI = 12)

Konzentration Arg <sub>2</sub> c [nM]	Änderung der optischen Schichtdicke $\Delta nd$ [nm]
3	0.000
10	0.000
30	0.002
70	0.002
100	0.001
300	0.000
500	0.000
700	0.005
1000	0.000
1000	0.001



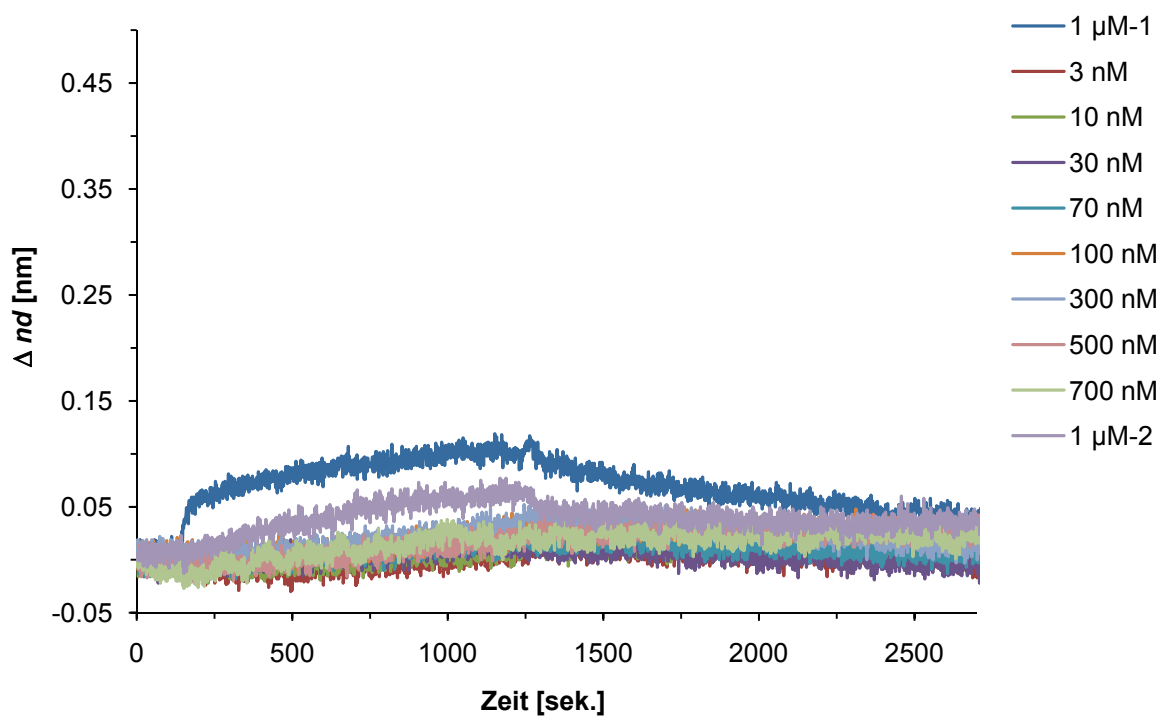
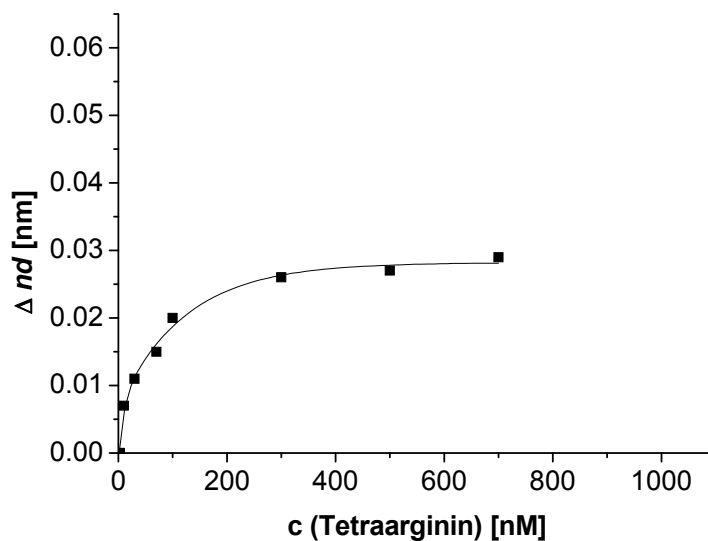
**Triarginin Arg<sub>3</sub>** (0.5 kDa, pI = 12.0)

Konzentration Arg <sub>3</sub> c [nM]	Änderung der optischen Schichtdicke $\Delta nd$ [nm]
3	0.000
10	0.000
30	0.000
70	0.000
100	0.000
300	0.000
500	0.000
700	0.004
1000	0.005
1000	0.001



**Tetraarginin Arg<sub>4</sub>** (0.6 kDa, pI = 12.0)

Konzentration Arg <sub>4</sub> c [nM]	Änderung der optischen Schichtdicke $\Delta nd$ [nm]
3	0.000
10	0.007
30	0.011
70	0.015
100	0.020
300	0.026
500	0.027
700	0.029
1000	0.097
1000	0.058



$$K_a = 3.0 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$$

$$K_D = 3.3 \cdot 10^{-8} \text{ M}$$

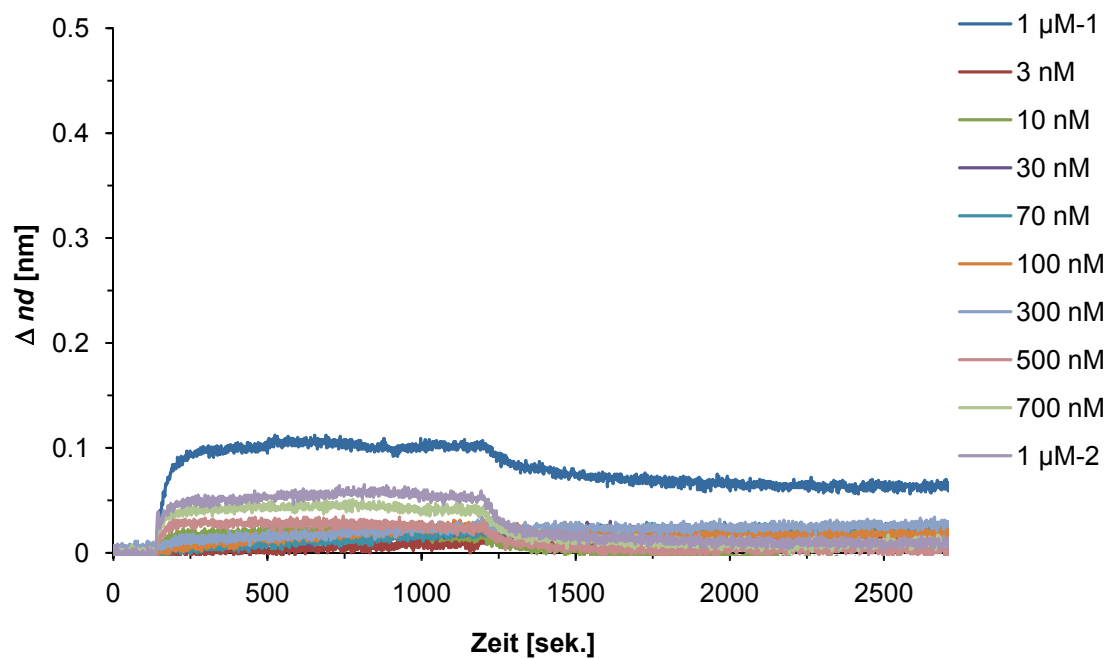
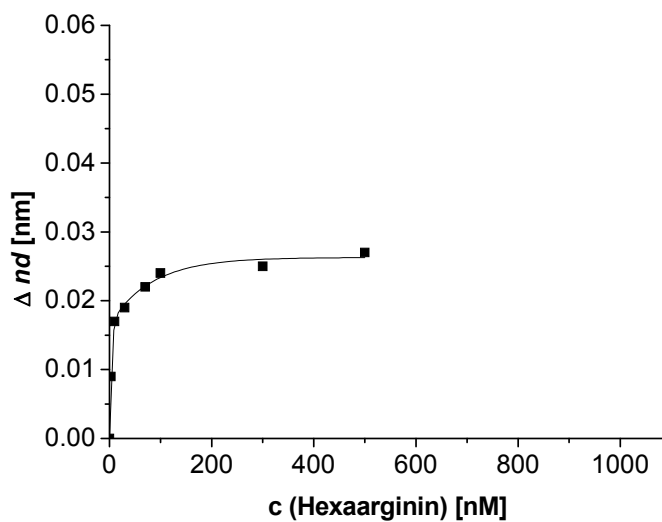
$$k_a = 2.9 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$k_d = 4.6 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$$



**Hexaarginin Arg<sub>6</sub>** (1.0 kDa, pI = 12.0)

Konzentration Arg <sub>6</sub> c [nM]	Änderung der optischen Schichtdicke $\Delta nd$ [nm]
3	0.009
10	0.017
30	0.019
70	0.022
100	0.024
300	0.025
500	0.027
700	0.044
1000	0.103
1000	0.055



$$K_a = 2.5 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$$

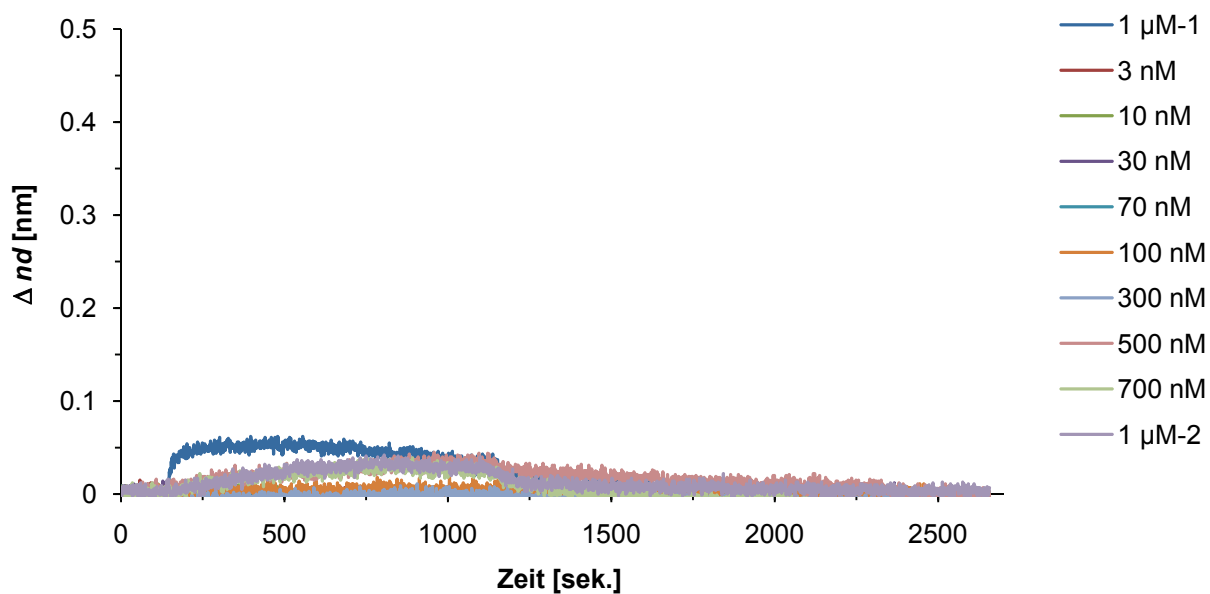
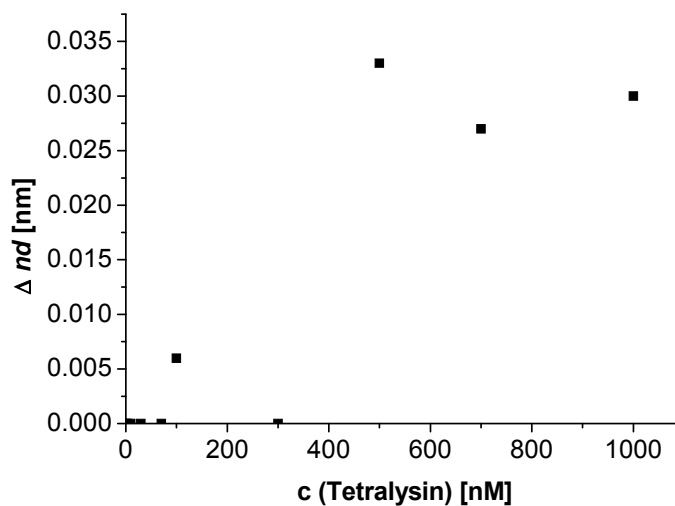
$$K_D = 5.6 \cdot 10^{-9} \text{ M}$$

$$k_a = 2.7 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$k_d = 3.6 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$$

### Tetralysin Lys<sub>4</sub> (0.5 kDa, pI = 10.5)

Konzentration Lys <sub>4</sub> c [nM]	Änderung der optischen Schichtdicke $\Delta nd$ [nm]
3	0.000
10	0.000
30	0.000
70	0.000
100	0.006
300	0.000
500	0.033
700	0.027
1000	0.049
1000	0.030



$$K_a = 8.7 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$$

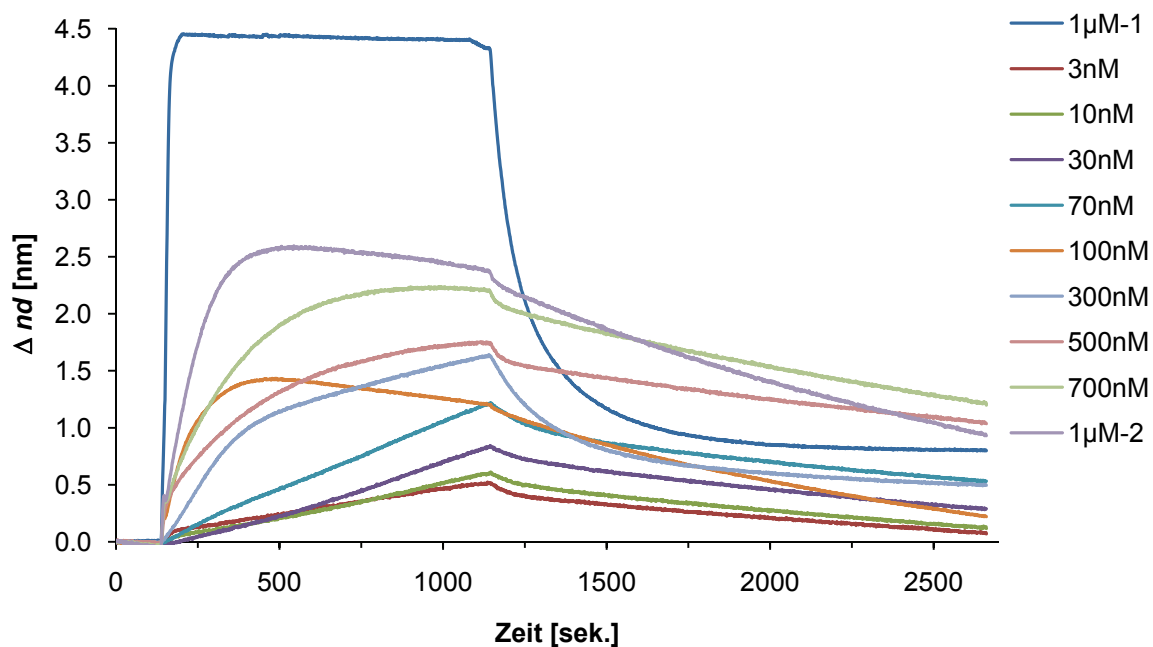
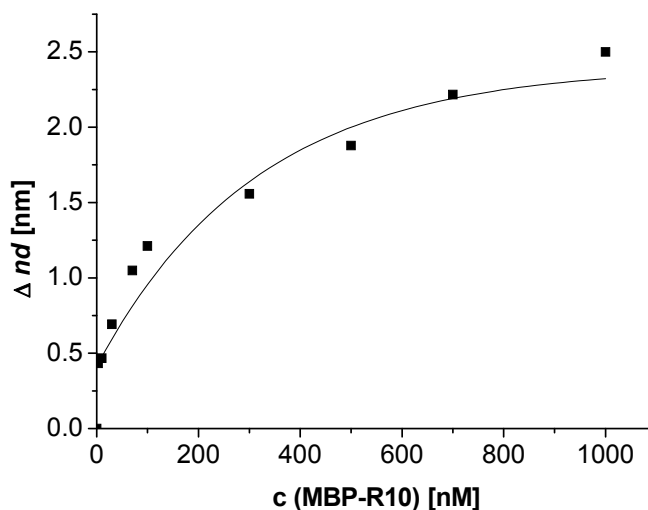
$$K_D = 1.1 \cdot 10^{-7} \text{ M}$$

$$k_a = 2.9 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$k_d = 3.4 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$$

**MBP-R10** (ungetaggt: 42.5 kDa, pI = 5.1, Arg: 10, Lys: 72, Asp+Glu: 178, 28280 Å<sup>2</sup>)

Konzentration MBP-R10 c [nM]	Änderung der optischen Schichtdicke $\Delta nd$ [nm]
3	0.433
10	0.466
30	0.692
70	1.053
100	1.316
300	1.455
500	1.698
700	2.218
1000	4.410
1000	2.503



$$K_a = 1.4 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$$

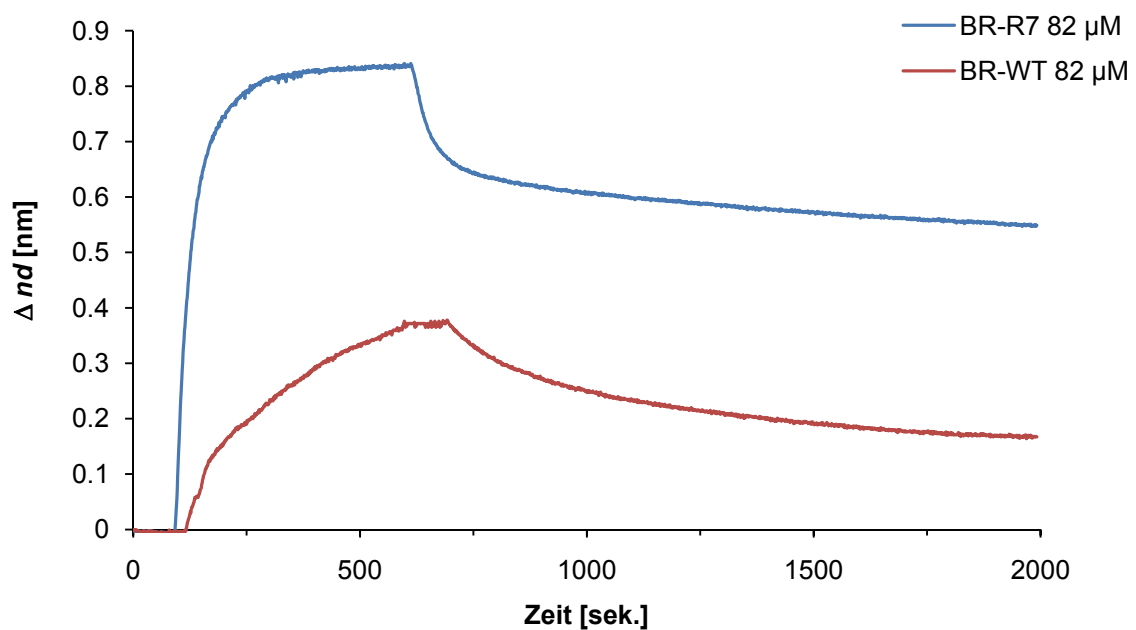
$$K_D = 7.3 \cdot 10^{-8} \text{ M}$$

$$k_a = 9.5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$k_d = 6.9 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$$

**BR-R7 (Bakteriorhodopsin)** (ungetaggt: 26.8 kDa, pI = 5.2, Arg: 5, Lys: 7, Asp+Glu: 18, 12740 Å<sup>2</sup>)

Konzentration BR-R7 c [μM]	Änderung der optischen Schichtdicke Δnd [nm]
82	0.823
Wildtyp	0.371



Bakteriorhodopsin R-7

$$K_a = 1.7 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$$

$$K_D = 6.0 \cdot 10^{-7} \text{ M}$$

$$k_a = 218 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$k_d = 1.3 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$$

Wildtyp

$$K_a = 6.8 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$$

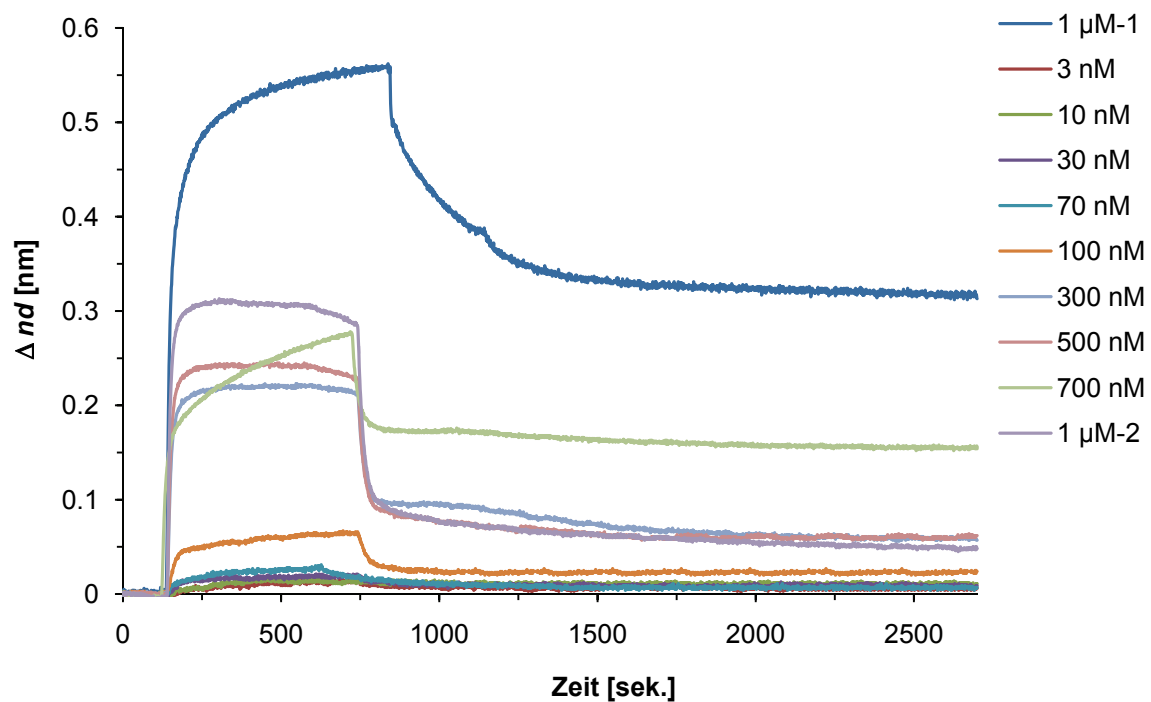
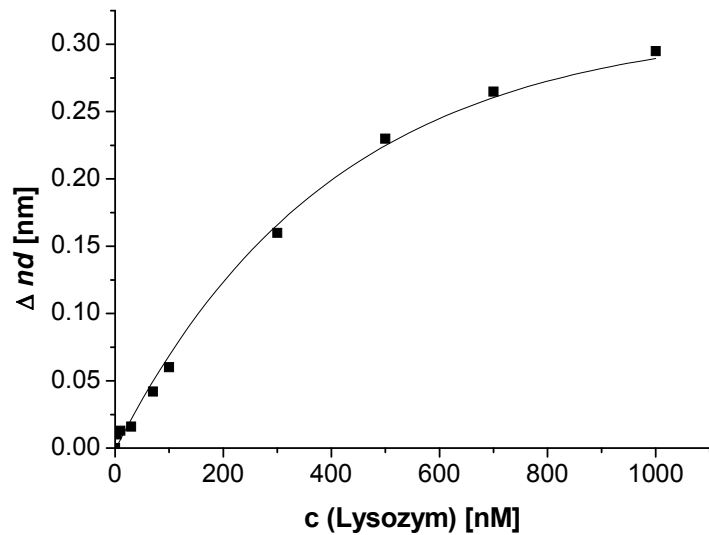
$$K_D = 1.5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$$

$$k_a = 39 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$k_d = 5.8 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$$

**Lysozym** (14.5 kDa, pI = 9.1, Arg: 11, Lys: 7, Asp+Glu: 9, 8469 Å<sup>2</sup>)

Konzentration Lysozym c [nM]	Änderung der optischen Schichtdicke $\Delta nd$ [nm]
3	0.010
10	0.013
30	0.016
70	0.042
100	0.060
300	0.230
500	0.241
700	0.265
1000	0.538
1000	0.300



$$K_a = 1.1 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$$

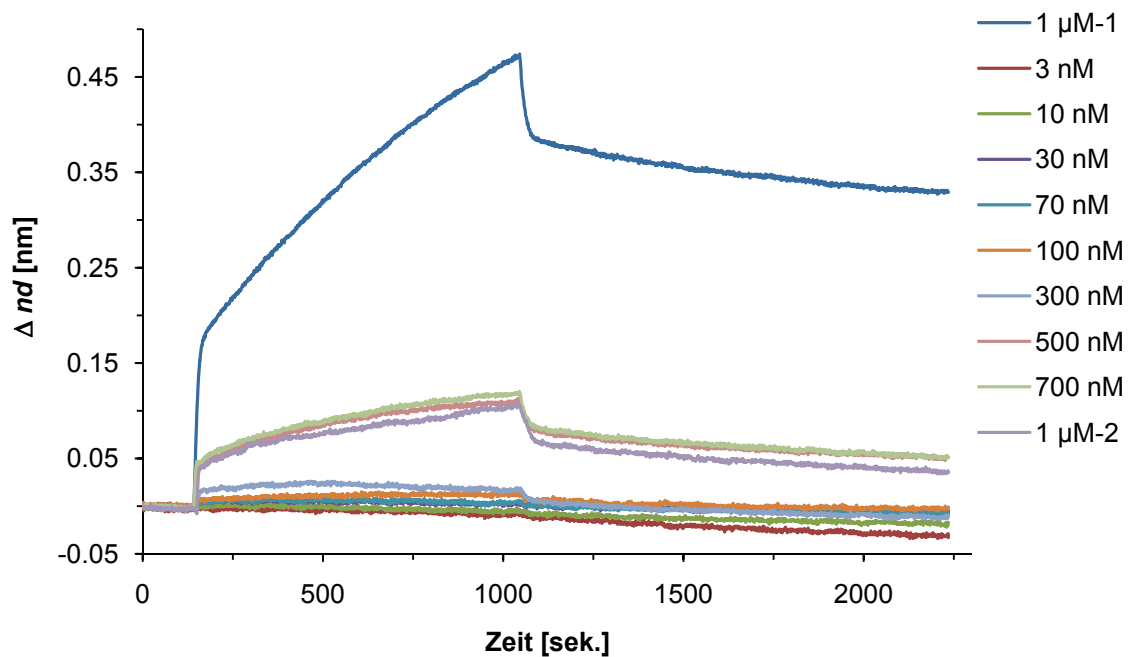
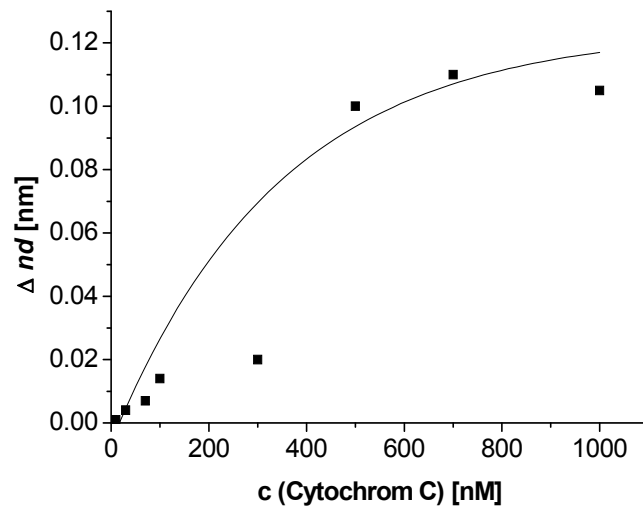
$$K_D = 8.9 \cdot 10^{-8} \text{ M}$$

$$k_a = 4.7 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$k_d = 5.6 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$$

**Cytochrom C** (12.3 kDa, pI = 9.2, Arg: 2, Lys: 16, Asp+Glu: 12, 6258 Å<sup>2</sup>)

Konzentration Cytochrom C c [nM]	Änderung der optischen Schichtdicke $\Delta nd$ [nm]
3	0.001
10	0.001
30	0.004
70	0.007
100	0.014
300	0.020
500	0.106
700	0.115
1000	0.460
1000	0.105



$$K_a = 6.4 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$$

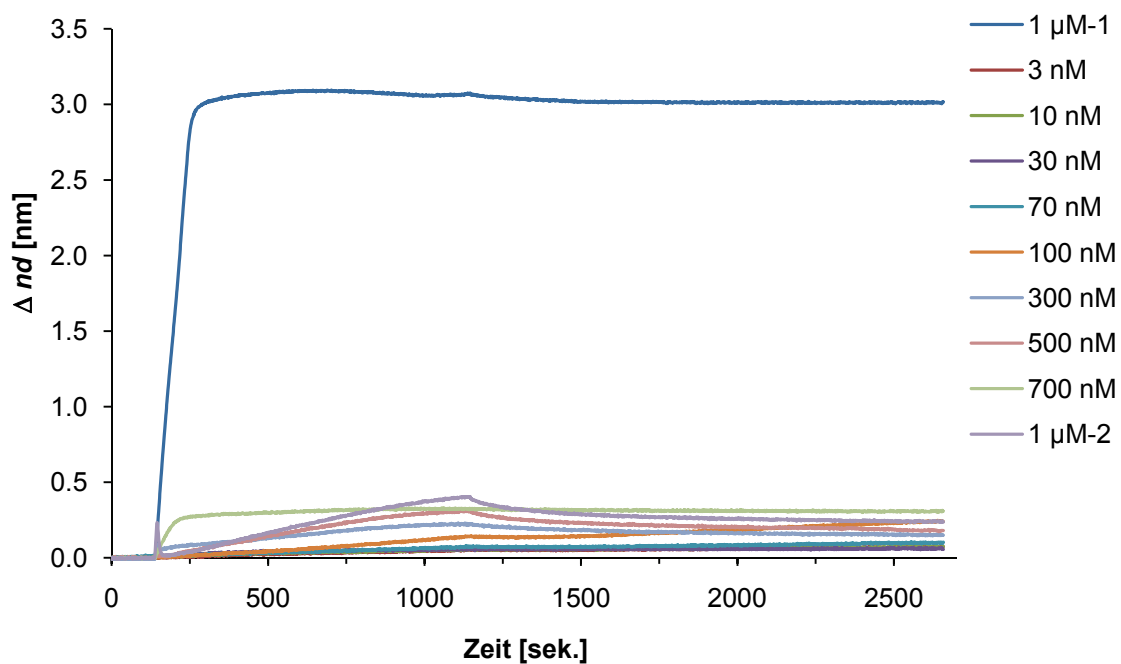
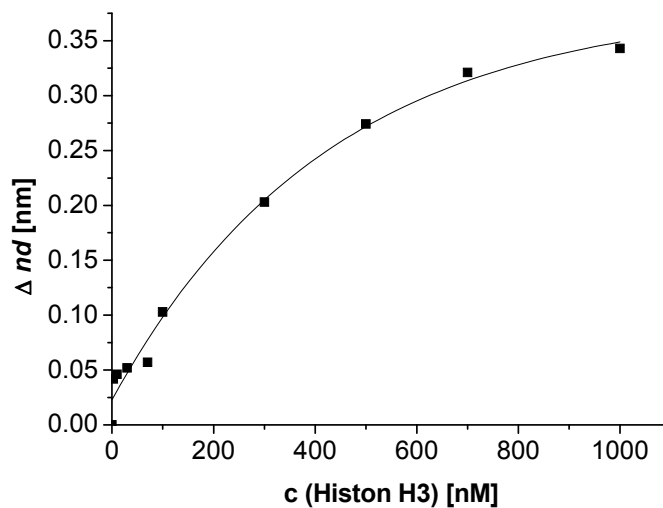
$$K_D = 1.6 \cdot 10^{-7} \text{ M}$$

$$k_a = 1.2 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$k_d = 8.4 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$$

**Histon H3** (15.3 kDa, pI = 11.5, Arg: 10, Lys: 8, Asp+Glu: 8, 5789 Å<sup>2</sup>)

Konzentration Histon H3 c [nM]	Änderung der optischen Schichtdicke $\Delta nd$ [nm]
3	0.042
10	0.046
30	0.052
70	0.057
100	0.103
300	0.203
500	0.274
700	0.321
1000	3.075
1000	0.343



$$K_a = 2.7 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$$

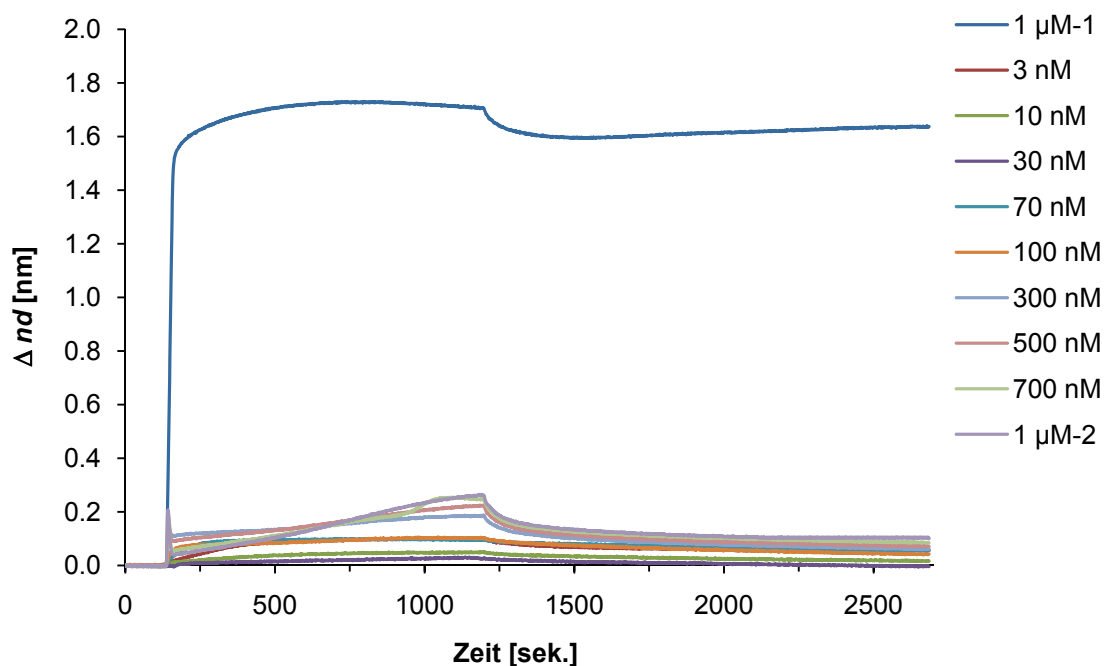
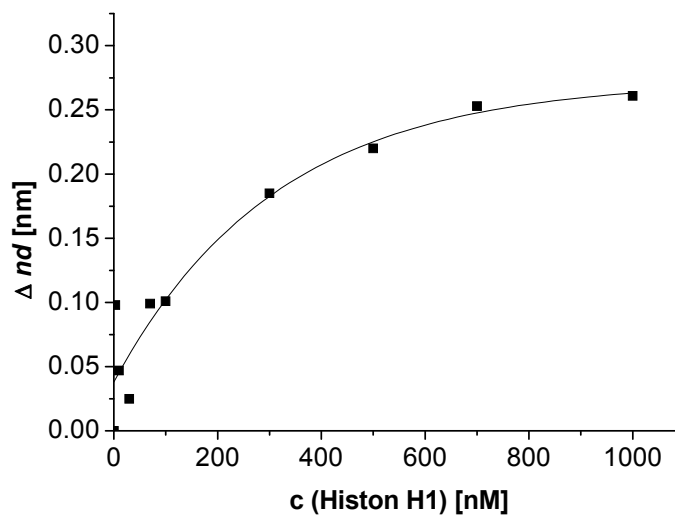
$$K_D = 3.7 \cdot 10^{-7} \text{ M}$$

$$k_a = 2.3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$k_d = 6.8 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$$

# Histon H1 (22.0 kDa, pI = 10.4)

Konzentration Histon H1 c [nM]	Änderung der optischen Schichtdicke $\Delta nd$ [nm]
3	0.098
10	0.047
30	0.025
70	0.099
100	0.101
300	0.185
500	0.220
700	0.253
1000	1.723
1000	0.26



$$K_a = 4.5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$$

$$K_D = 2.2 \cdot 10^{-7} \text{ M}$$

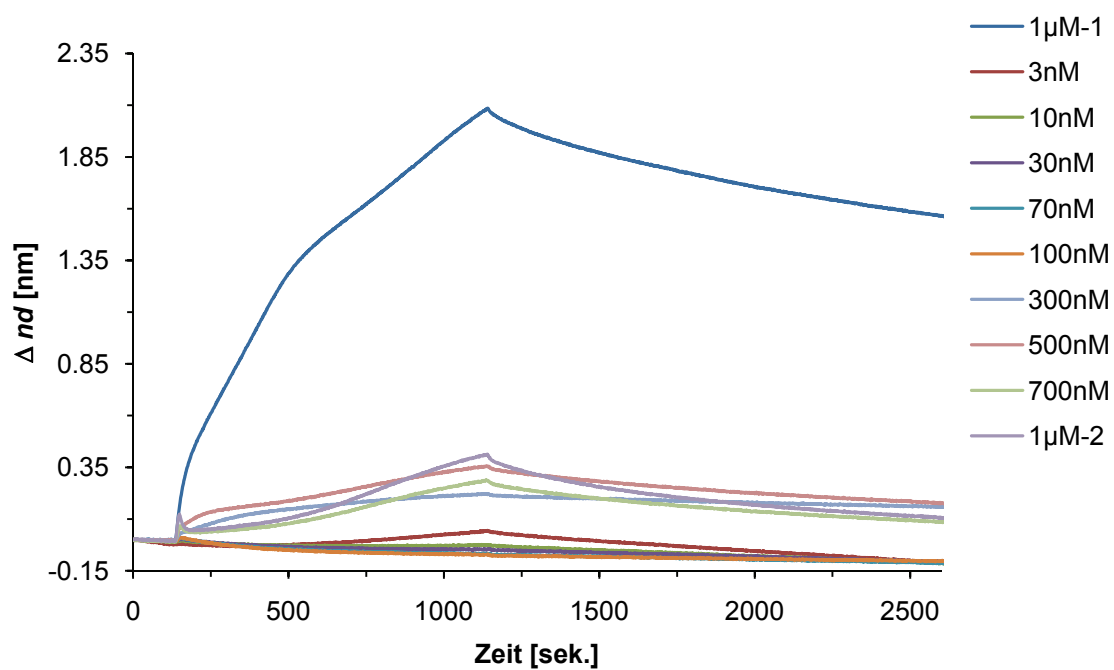
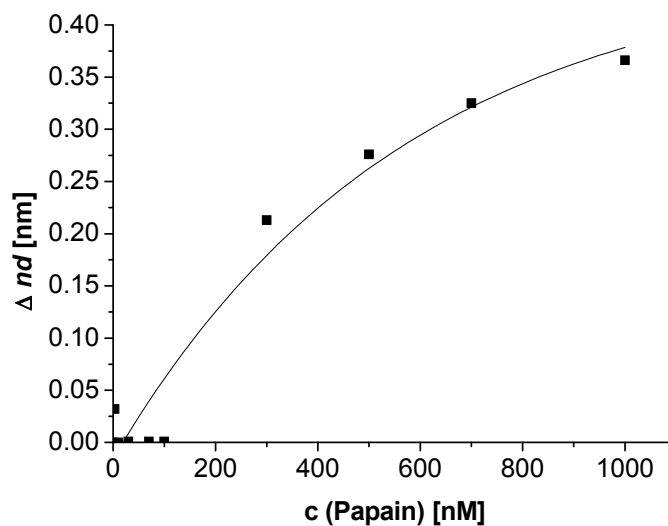
$$k_a = 5.0 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$k_d = 6.8 \cdot 10^{-8} \text{ s}^{-1}$$



**Papain** (21.0 kDa, pI = 8.8, Arg: 9, Lys: 13, Glu+Asp: 24, 9413 Å<sup>2</sup>)

Konzentration Papain c [nM]	Änderung der optischen Schichtdicke $\Delta nd$ [nm]
3	0.032
10	0.001
30	0.001
70	0.001
100	0.001
300	0.213
500	0.276
700	0.325
1000	1.995
1000	0.366



$$K_a = 2.0 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$$

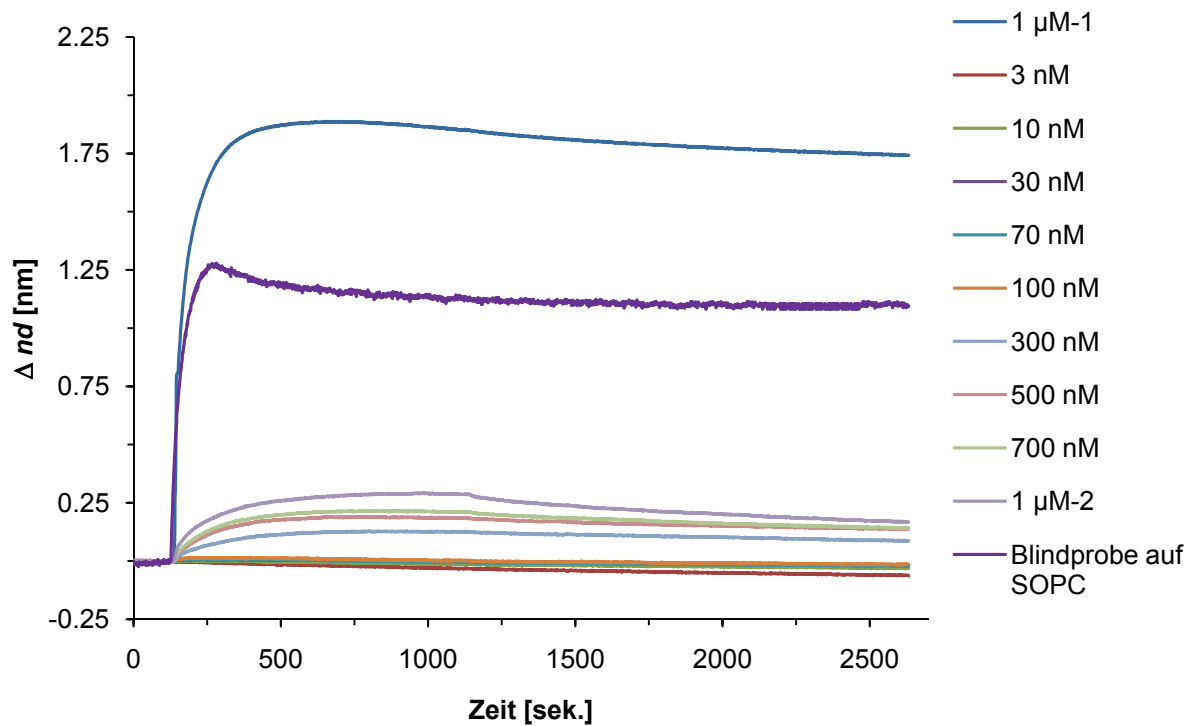
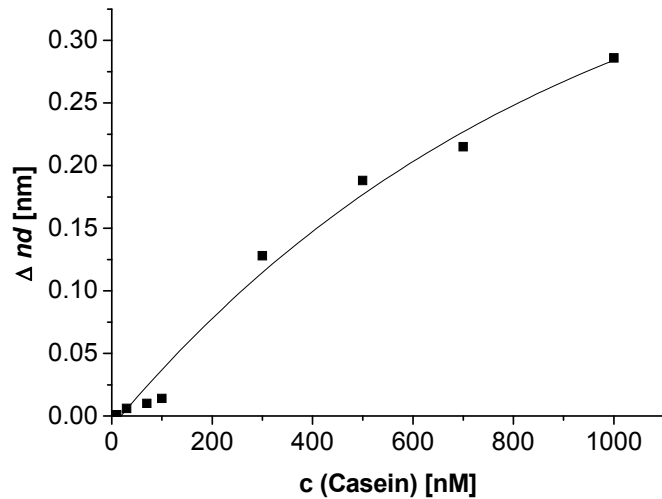
$$K_D = 5.0 \cdot 10^{-7} \text{ M}$$

$$k_a = 1.8 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$k_d = 1.6 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$$

**Casein (19.1 kDa, pI = 5.0)**

Konzentration Casein c [nM]	Änderung der optischen Schichtdicke $\Delta nd$ [nm]
3	0.001
10	0.001
30	0.006
70	0.010
100	0.014
300	0.128
500	0.188
700	0.215
1000	1.885
1000	0.286



$$K_a = 9.3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$$

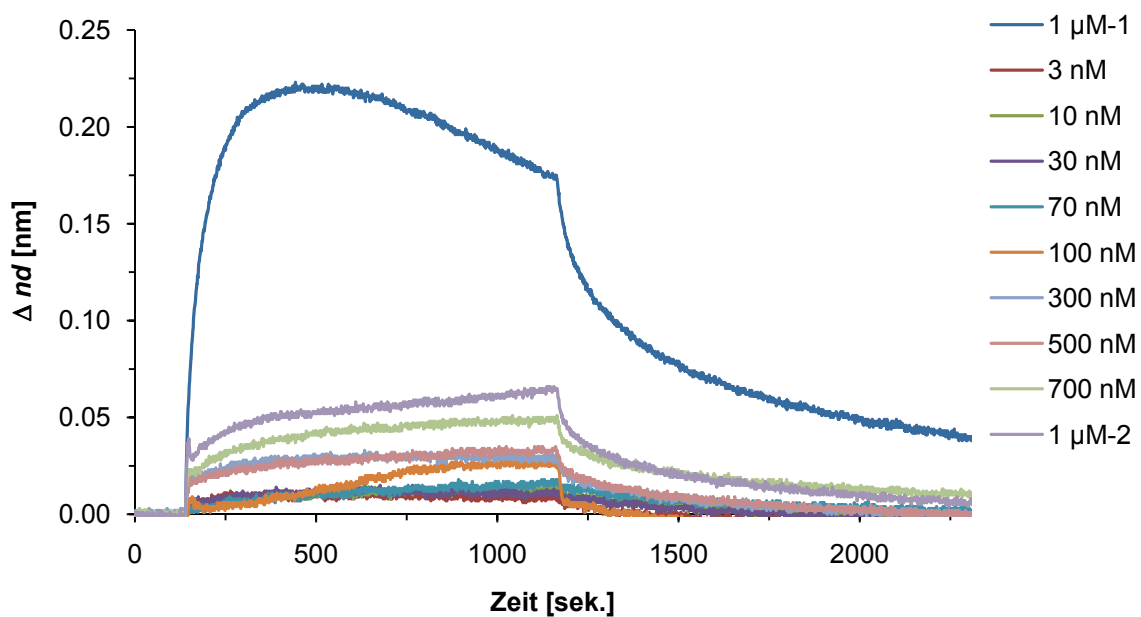
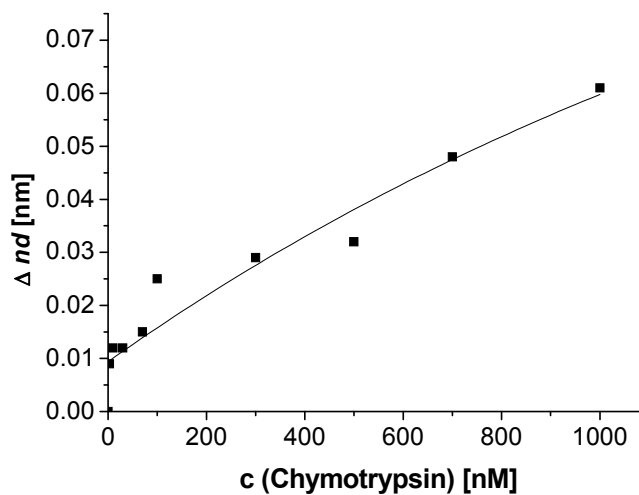
$$K_D = 1.1 \cdot 10^{-6} \text{ M}$$

$$k_a = 1.5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$k_d = 5.0 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$$

**Chymotrypsin** (25.3 kDa, pI = 8.5, Arg: 3, Lys: 16, Asp+Glu: 24, 10132 Å<sup>2</sup>)

Konzentration Chymotrypsin c [nM]	Änderung der optischen Schichtdicke $\Delta nd$ [nm]
3	0.009
10	0.012
30	0.012
70	0.015
100	0.025
300	0.029
500	0.032
700	0.048
1000	0.203
1000	0.061



$$K_a = 6.0 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$$

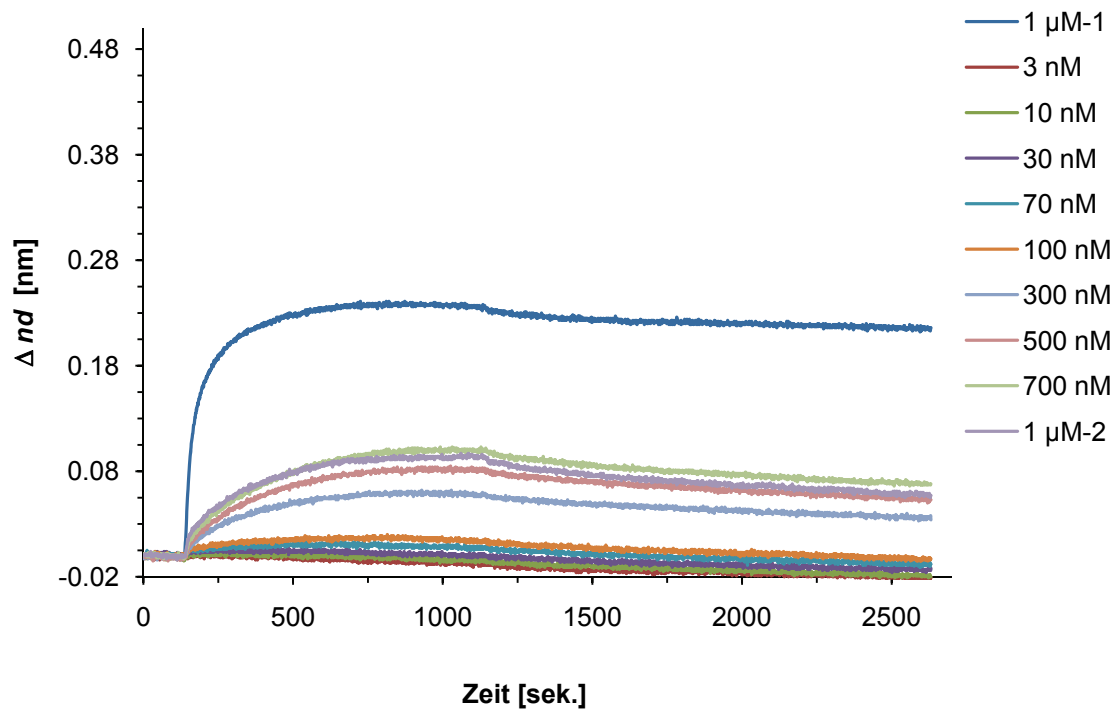
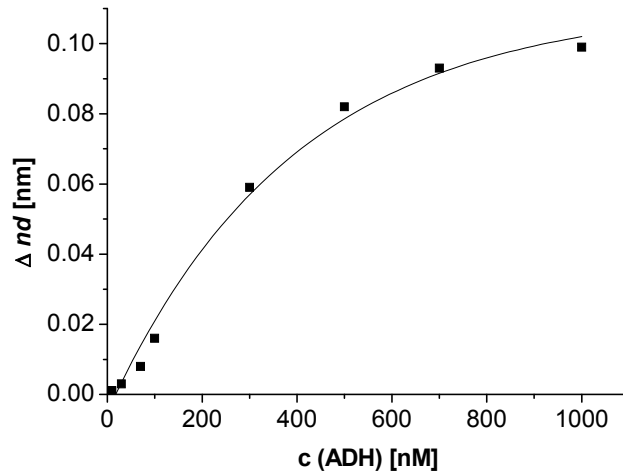
$$K_D = 1.7 \cdot 10^{-7} \text{ M}$$

$$k_a = 1.62 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$k_d = 7.2 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$$

**ADH** (141.0 kDa, pI = 5.6, Arg: 26, Lys: 19, Asp+Glu: 258, 53000 Å<sup>2</sup>)

Konzentration ADH c [nM]	Änderung der optischen Schichtdicke $\Delta nd$ [nm]
3	0.000
10	0.001
30	0.003
70	0.008
100	0.016
300	0.059
500	0.082
700	0.093
1000	0.237
1000	0.099



$$K_a = 2.2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$$

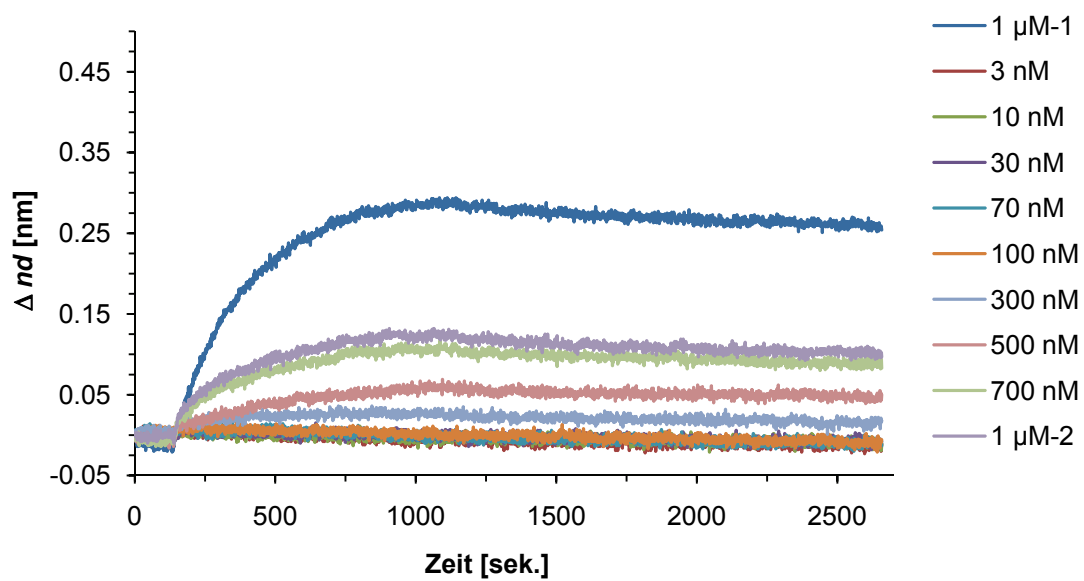
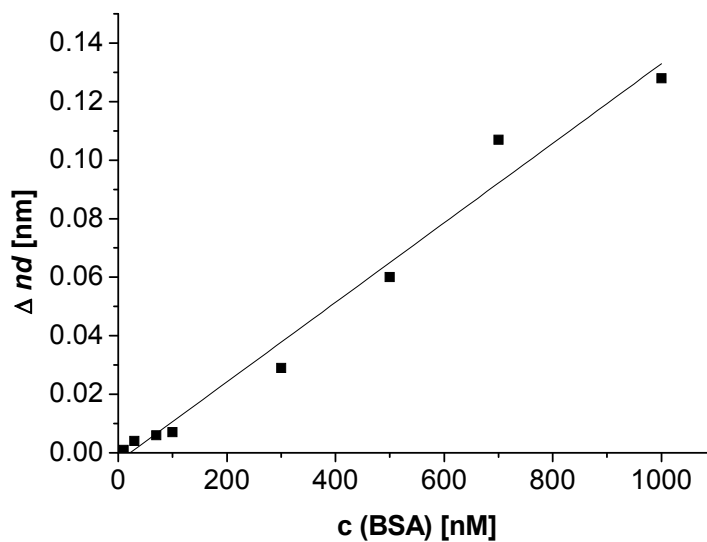
$$K_D = 4.4 \cdot 10^{-7} \text{ M}$$

$$k_a = 4.2 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$k_d = 2.4 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$$

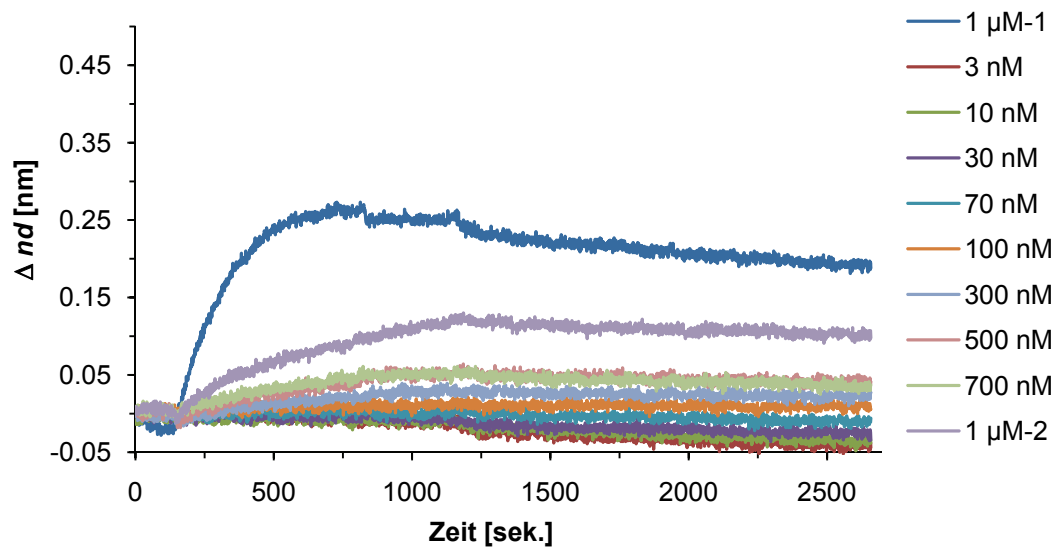
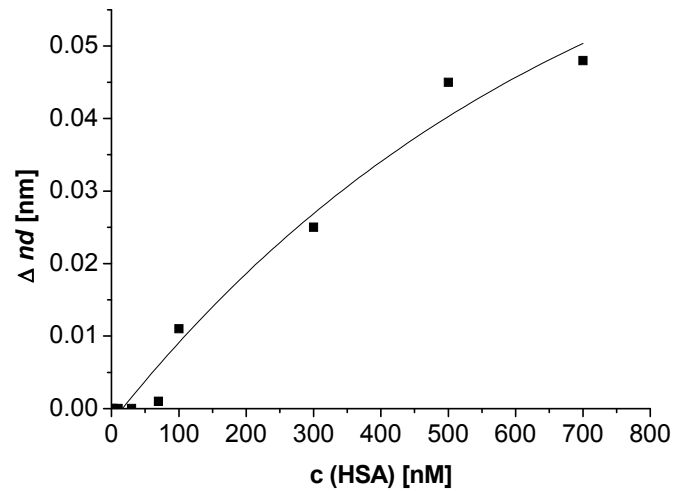
**BSA** (66 kDa, pI = 5.8)

Konzentration BSA c [nM]	Änderung der optischen Schichtdicke $\Delta nd$ [nm]
3	0.000
10	0.001
30	0.004
70	0.006
100	0.007
300	0.029
500	0.045
700	0.048
1000	0.280
1000	0.128



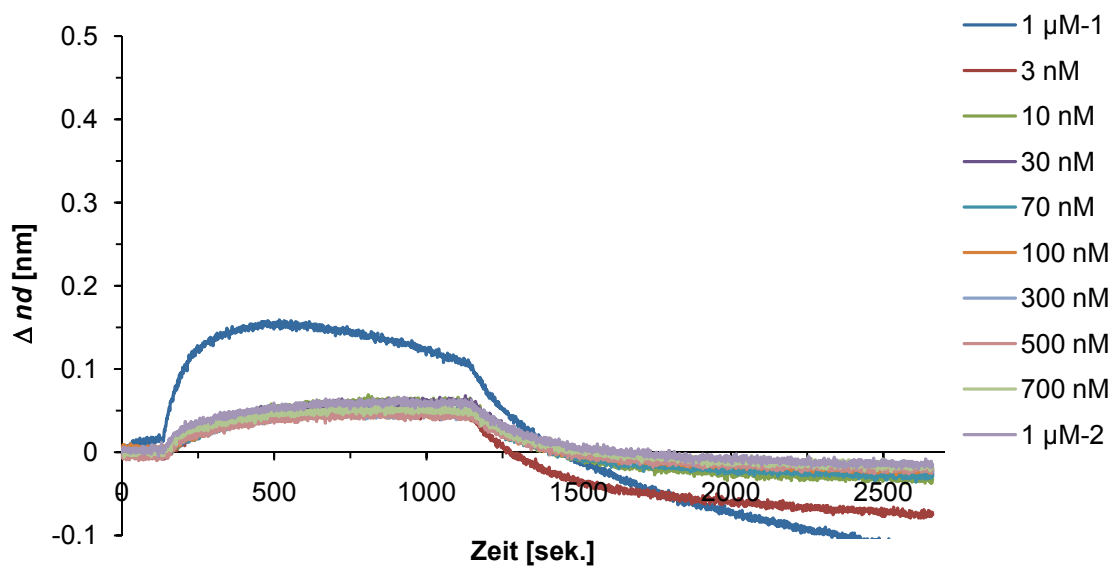
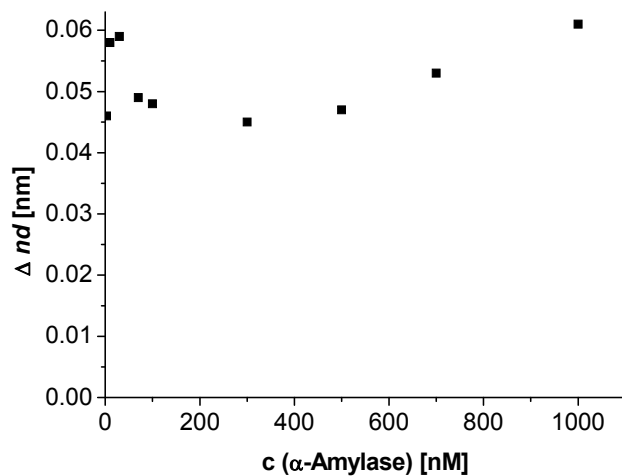
**HSA** (66 kDa, pI = 5.8, Arg: 22, Lys: 41, Asp+Glu: 82, 28213 Å<sup>2</sup>)

Konzentration HSA c [nM]	Änderung der optischen Schichtdicke $\Delta nd$ [nm]
3	0.000
10	0.000
30	0.000
70	0.001
100	0.011
300	0.025
500	0.045
700	0.048
1000	0.255
1000	0.106



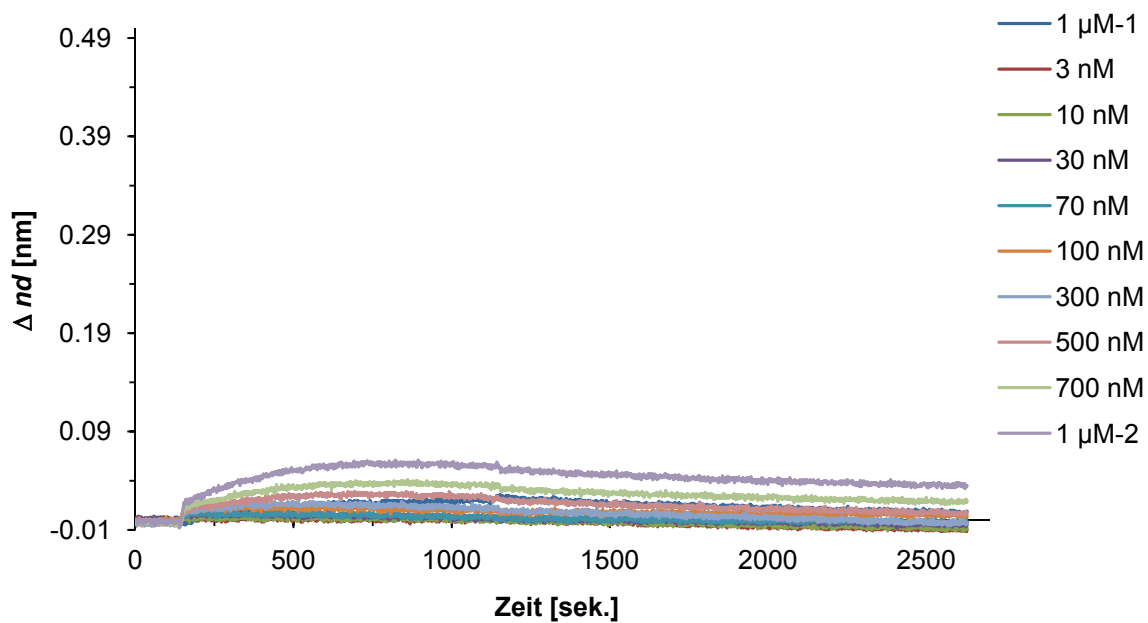
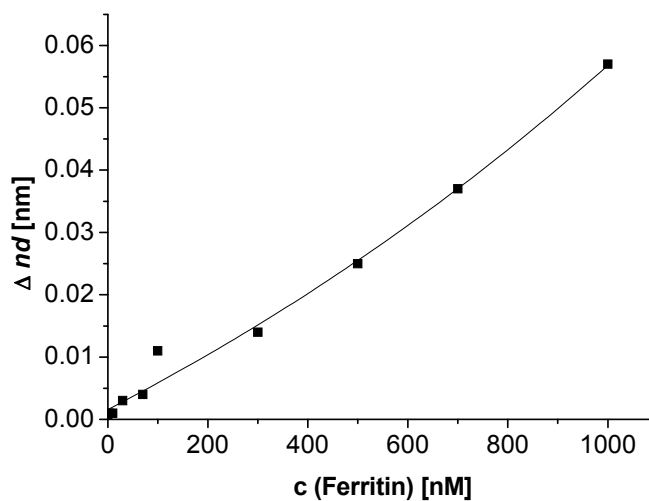
$\alpha$ -Amylase (55.0 kDa, pI = 6.0, Arg: 19, Lys: 19, Asp+Glu: 85, 17211 Å<sup>2</sup>)

Konzentration $\alpha$ -Amylase c [nM]	Änderung der optischen Schichtdicke $\Delta nd$ [nm]
3	0.046
10	0.058
30	0.059
70	0.049
100	0.048
300	0.045
500	0.047
700	0.053
1000	0.149
1000	0.061



**Ferritin** (440 kDa,  $pI = 5.4$ , Arg: 240, Lys: 240, Asp+Glu: 1296, 229608 Å<sup>2</sup>)

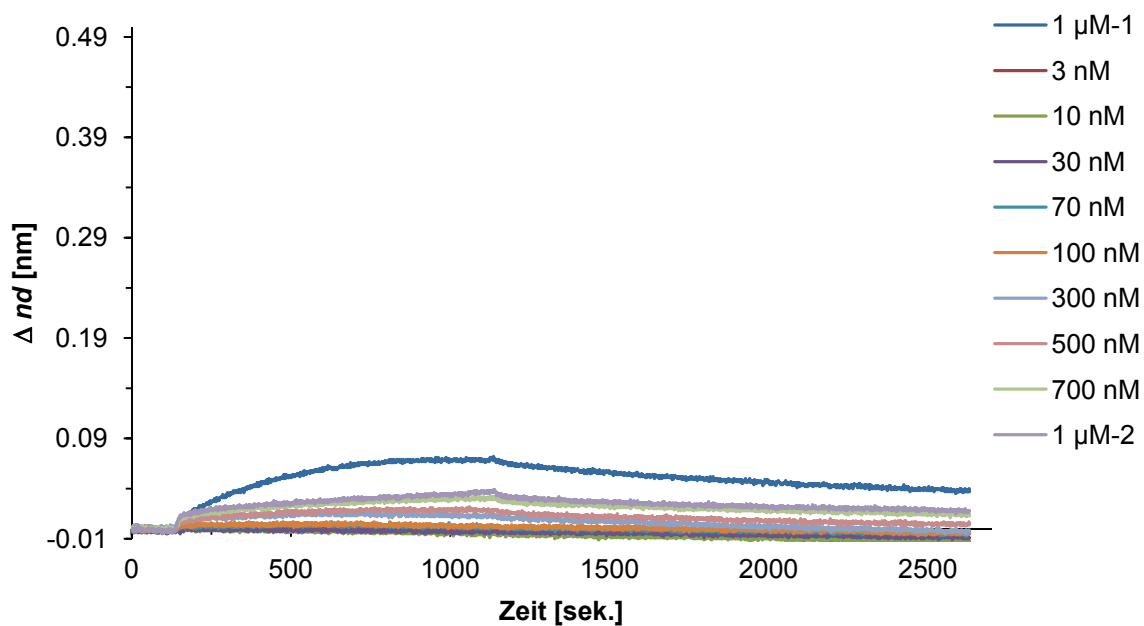
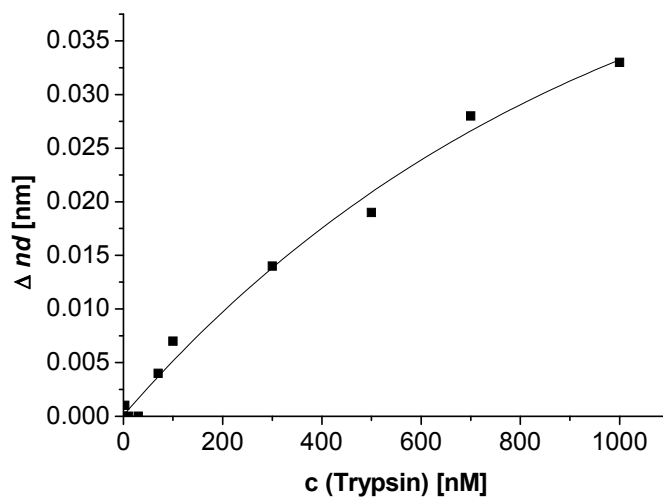
Konzentration Ferritin $c$ [nM]	Änderung der optischen Schichtdicke $\Delta nd$ [nm]
3	0.001
10	0.001
30	0.003
70	0.004
100	0.011
300	0.014
500	0.025
700	0.037
1000	0.057
1000	0.019





**Trypsin** (23.8 kDa, pI = 8.3, Arg: 21, Lys: 14, Asp+Glu: 14, 9022 Å<sup>2</sup>)

Konzentration Trypsin c [nM]	Änderung der optischen Schichtdicke $\Delta nd$ [nm]
3	0.001
10	0.000
30	0.000
70	0.004
100	0.007
300	0.014
500	0.019
700	0.028
1000	0.068
1000	0.033



$$K_a = 1.0 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$$

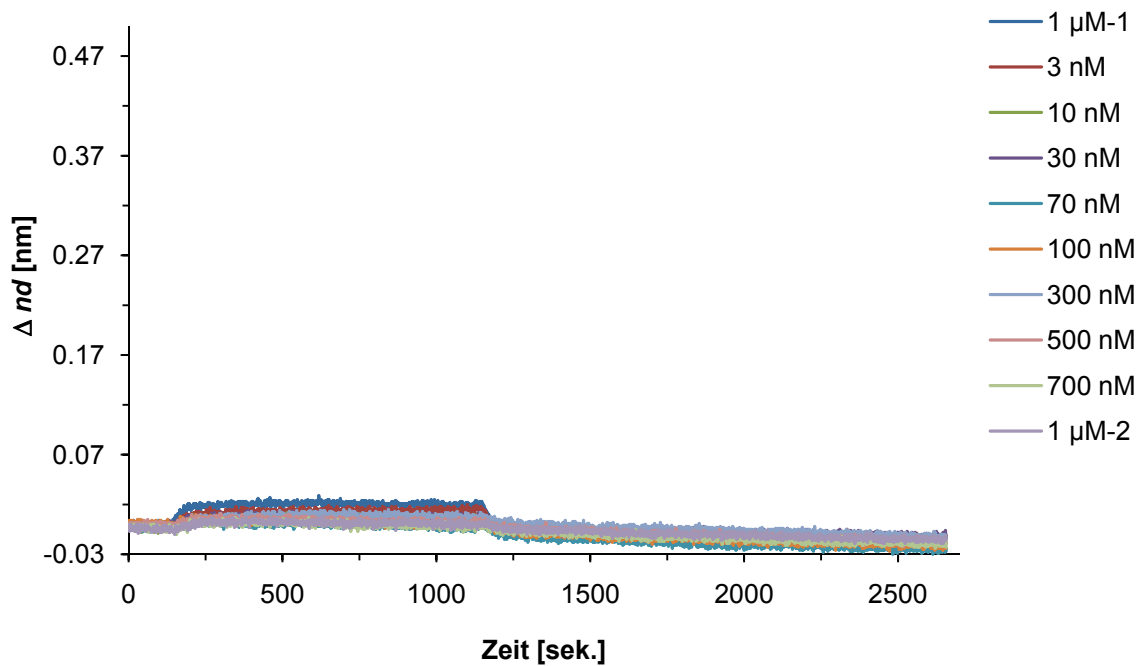
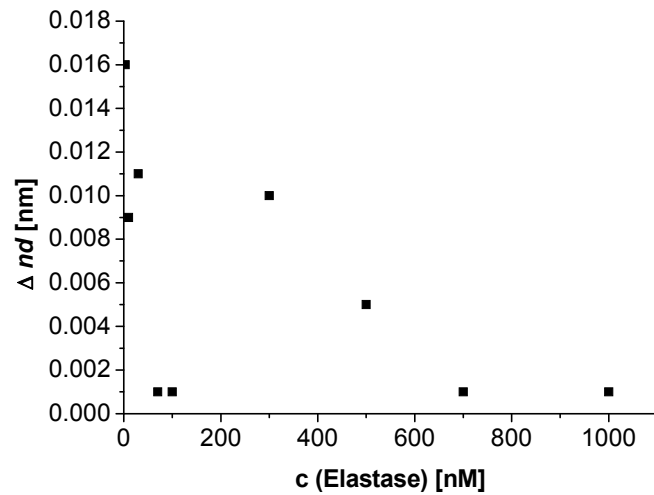
$$K_D = 1.0 \cdot 10^{-6} \text{ M}$$

$$k_a = 3.1 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$k_d = 3.6 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$$

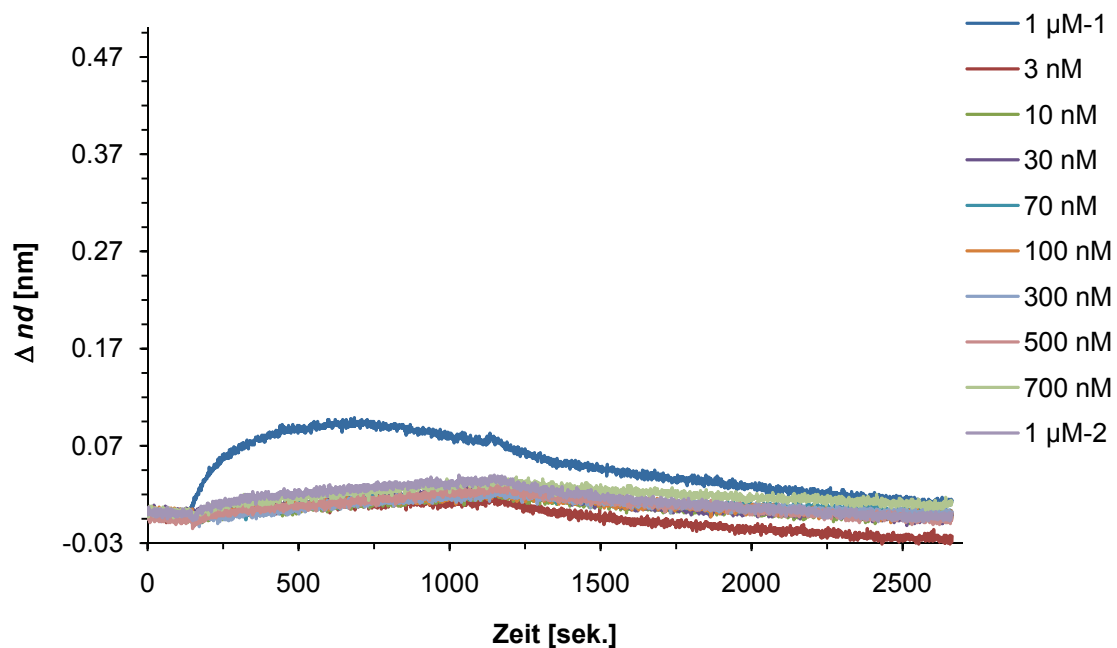
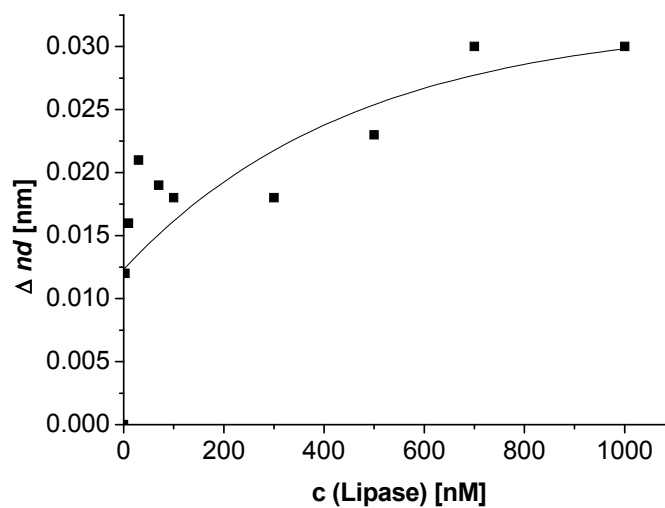
**Elastase** (26.0 kDa, pI = 8.7, Arg: 23, Lys: 3, Asp+Glu: 17, 10305 Å<sup>2</sup>)

Konzentration Elastase c [nM]	Änderung der optischen Schichtdicke $\Delta nd$ [nm]
3	0.016
10	0.009
30	0.011
70	0.001
100	0.001
300	0.010
500	0.005
700	0.001
1000	0.001
1000	0.023



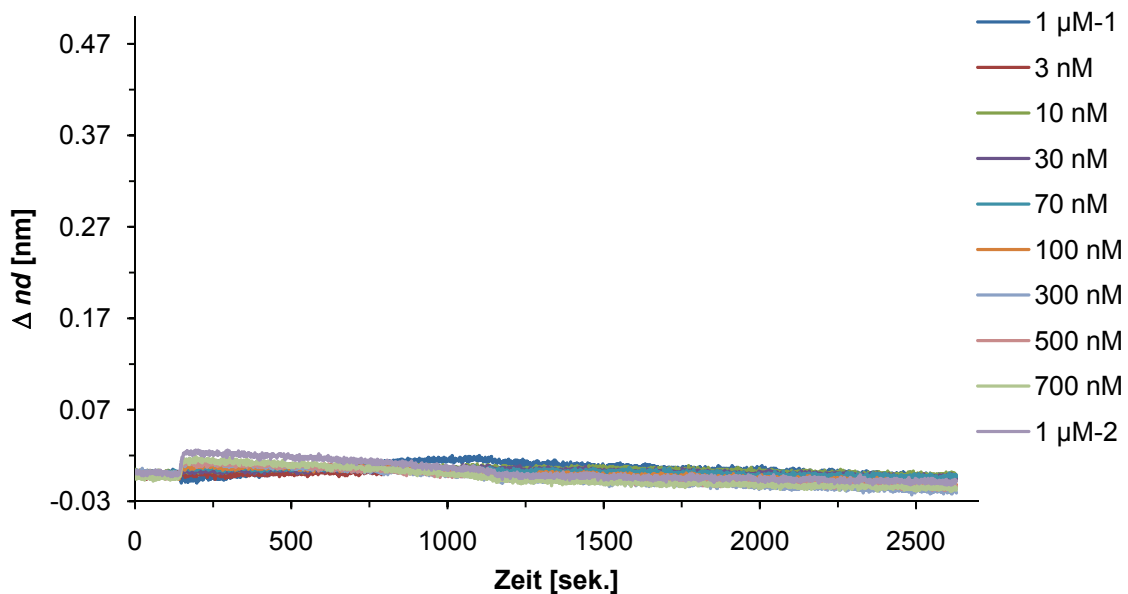
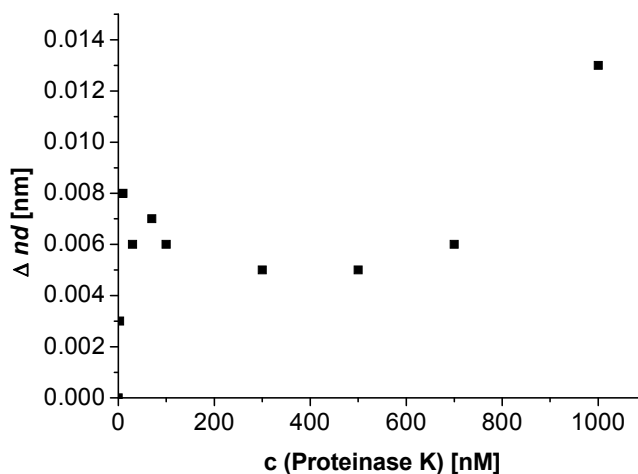
**Lipase** (50.0 kDa, pI = 5.4, Arg: 7, Lys: 29, Asp+Glu: 78, 17195 Å<sup>2</sup>)

Konzentration Lipase c [nM]	Änderung der optischen Schichtdicke $\Delta nd$ [nm]
3	0.012
10	0.016
30	0.021
70	0.019
100	0.018
300	0.018
500	0.023
700	0.030
1000	0.083
1000	0.030



**Proteinase K** (28.9 kDa, pI = 7.7, Arg: 9, Lys: 7, Asp+Glu: 14, 10078 Å<sup>2</sup>)

Konzentration Proteinase K c [nM]	Änderung der optischen Schichtdicke $\Delta nd$ [nm]
3	0.003
10	0.008
30	0.006
70	0.007
100	0.006
300	0.005
500	0.005
700	0.006
1000	0.013
1000	0.013



## 5.6. Fluoreszenz-Titrationsen mit Peptiden und Proteinen

Zur Bestimmung von Assoziationskonstanten mit Peptiden und Proteinen, wird der synthetisierte dansylhaltige Fluoreszenzrezeptor **12** in wässrigem HEPES-Puffer (20 mM, 150 mM NaCl, pH = 7.5) gelöst ( $c_{12} = 4.98 \cdot 10^{-6}$  bis  $3.19 \cdot 10^{-4}$  M). Eine Protein- oder Peptidstammlösung wird durch Lösen des jeweiligen Peptids/Proteins in der gepufferten Rezeptorlösung ( $c_{\text{Peptid/Protein}} = 1.00 \cdot 10^{-3}$  bis  $7.63 \cdot 10^{-4}$  M) hergestellt. So ist gewährleistet, dass die Rezeptorkonzentration während des Titrationsvorgangs konstant bleibt. Für die Titrationsen werden 700  $\mu\text{L}$  Rezeptorlösung in einer rührbaren Rundküvette mit Rührfisch vorgelegt. Schrittweise wird bis zu 1 mL der Peptid-/Proteinstammlösung hinzutitriert. Nach jeder Zugabe wird die Lösung für 3 min. stehen gelassen, bevor ein Fluoreszenzspektrum (460-620 nm) aufgenommen wird. Die Anregungswellenlänge beträgt 330 nm und die Emissionsintensität wird bei 544 nm verfolgt. Es wird bei einer Temperatur von 25 °C gemessen.

Zur Bestimmung der Komplex-Stöchiometrie wird die Rezeptorkonzentration mit einem Korrekturfaktor multipliziert, bis der Job-Plot eine 1:1-Stöchiometrie aufzeigt. Dieser Korrekturfaktor stellt die im Experiment ermittelte Stöchiometrie dar.

Die Bindungskonstanten werden mit nichtlinearen Regressionsmethoden für einen simulierten 1:1-Komplex berechnet.

Um die Reproduzierbarkeit der gemessenen Daten zu überprüfen, wurden die Messungen mindestens dreimal wiederholt.

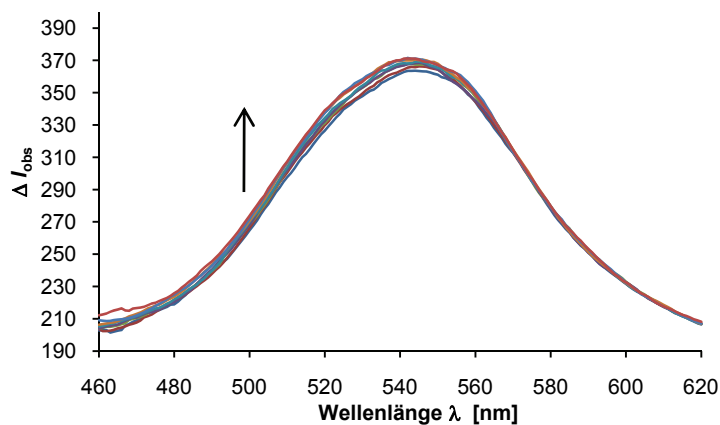
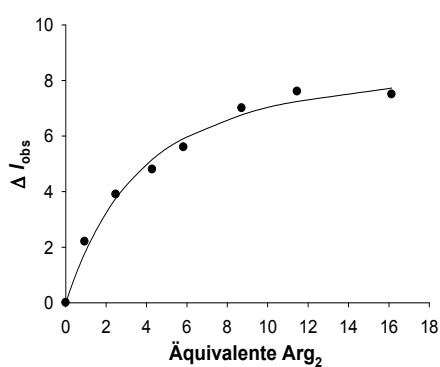
Folgende Abkürzungen werden in den Fluoreszenztitrationstabellen verwendet:

$V_{\text{Zugabe}}$ :	Zutitriertes Volumen an Protein oder Peptid
$V_{\text{gesamt}}$ :	Gesamtvolumen in der Küvette
$I_{544\text{nm}}$ :	Gemessene Fluoreszenzemission bei 544 nm
$\Delta I_{\text{obs}}$ :	Beobachtete Fluoreszenzemissionsänderung bei 544 nm
$\Delta I_{\text{calc}}$ :	Berechnete Fluoreszenzemissionsänderung bei 544 nm

**Diarginin:**  $c(\text{Arg}_2) = 1.00 \cdot 10^{-3} \text{ M}$        $c(\mathbf{12}) = 4.98 \cdot 10^{-6} \text{ M}$

Stöchiometrie: 3:1

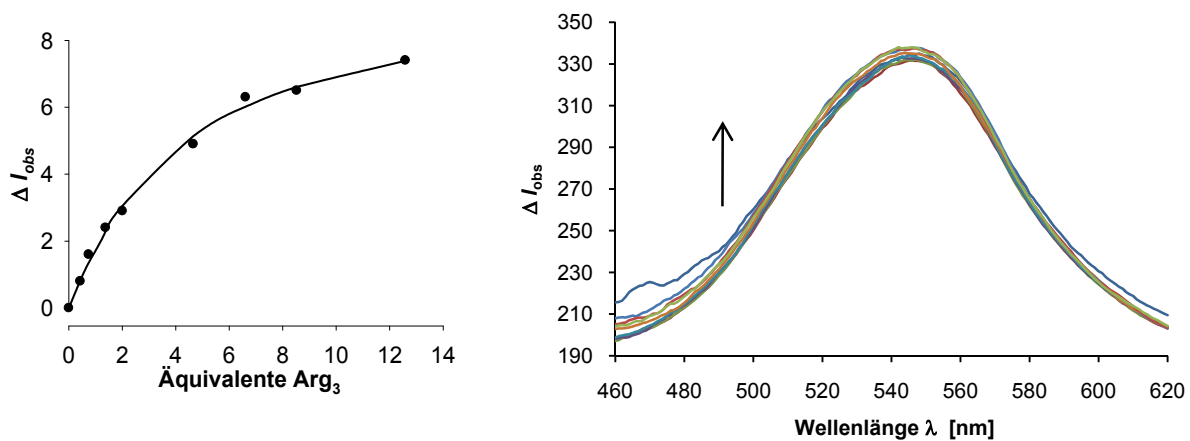
$K_a = 2.61 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$  ( $\pm 20 \%$ )



$V_{\text{Zugabe}}$ [μL]	$V_{\text{gesamt}}$ [μL]	[12] [M]	[Diarginin] [M]	[Diarginin] / [12]	$I_{544\text{nm}}$	$\Delta I_{\text{obs}}$	$\Delta I_{\text{calc}}$
0	700	$4.98 \cdot 10^{-6}$	0	0.00	363.5	0	0
10	710	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$1.41 \cdot 10^{-5}$	2.84	365.7	2.2	1.9
20	730	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$3.72 \cdot 10^{-5}$	7.48	367.4	3.9	3.8
20	750	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$6.43 \cdot 10^{-5}$	12.92	368.3	4.8	5.1
20	770	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$8.75 \cdot 10^{-5}$	17.59	369.1	5.6	5.9
40	810	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$1.31 \cdot 10^{-4}$	26.27	370.5	7.0	6.7
40	850	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$1.72 \cdot 10^{-4}$	34.56	371.1	7.6	7.2
80	930	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$2.42 \cdot 10^{-4}$	48.65	371.0	7.5	7.8

**Triarginin:**  $c(\text{Arg}_3) = 7.63 \cdot 10^{-4} \text{ M}$        $c(\mathbf{12}) = 1.00 \cdot 10^{-5} \text{ M}$

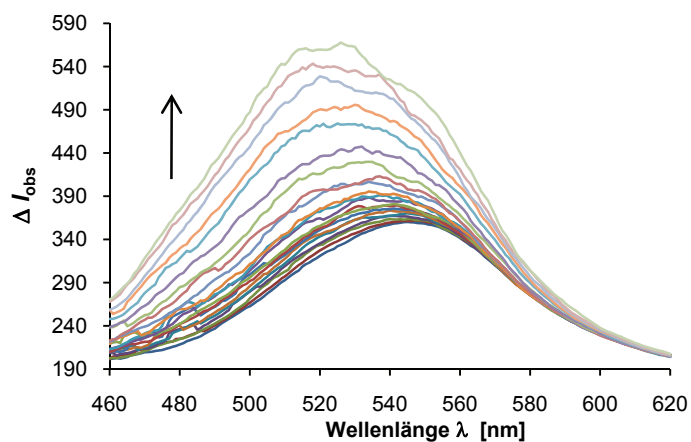
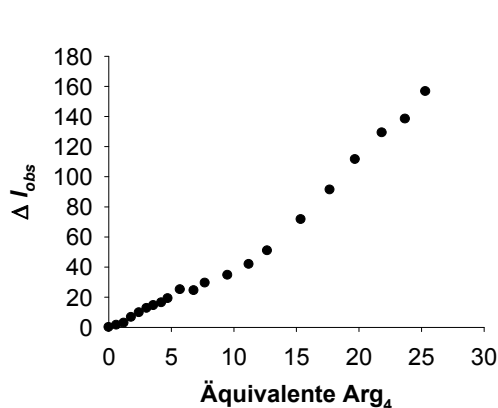
Stöchiometrie: 3:1       $K_a = 1.05 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} (\pm 12 \%)$



$V_{\text{Zugabe}}$ [ $\mu\text{L}$ ]	$V_{\text{gesamt}}$ [ $\mu\text{L}$ ]	[ $\mathbf{12}$ ] [M]	[Triarginin] [M]	[Triarginin] / [ $\mathbf{12}$ ]	$I_{544\text{nm}}$	$\Delta I_{\text{obs}}$	$\Delta I_{\text{calc}}$
0	700	$1.00 \cdot 10^{-5}$	0	0	330.3	0	0
10	710	$1.00 \cdot 10^{-5}$	$1.29 \cdot 10^{-5}$	1.29	331.1	0.8	0.9
10	720	$1.00 \cdot 10^{-5}$	$2.22 \cdot 10^{-5}$	2.22	331.9	1.6	1.4
20	740	$1.00 \cdot 10^{-5}$	$4.12 \cdot 10^{-5}$	4.12	332.7	2.4	2.3
20	760	$1.00 \cdot 10^{-5}$	$6.02 \cdot 10^{-5}$	6.02	333.2	2.9	3.1
100	860	$1.00 \cdot 10^{-5}$	$1.40 \cdot 10^{-4}$	13.97	335.2	4.9	5.1
80	940	$1.00 \cdot 10^{-5}$	$1.98 \cdot 10^{-4}$	19.83	336.6	6.3	6.0
120	1060	$1.00 \cdot 10^{-5}$	$2.56 \cdot 10^{-4}$	25.56	336.8	6.5	6.6
340	1400	$1.00 \cdot 10^{-5}$	$3.78 \cdot 10^{-4}$	37.77	337.7	7.4	7.4

**Tetraarginin:**  $c(\text{Arg}_4) = 7.19 \cdot 10^{-4} \text{ M}$      $c(\mathbf{12}) = 4.98 \cdot 10^{-6} \text{ M}$

Stöchiometrie: 5:2



$V_{\text{Zugabe}}$ [μL]	$V_{\text{gesamt}}$ [μL]	[12] [M]	[Tetraarginin] [M]	[Tetraarginin] / [12]	$I_{544\text{nm}}$	$\Delta I_{\text{obs}}$	$\Delta I_{\text{calc}}$
0	700	$4.98 \cdot 10^{-6}$	0	0	360.0	0	n. b.
10	710	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$9.19 \cdot 10^{-5}$	1.85	361.4	1.4	n. b.
10	720	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$1.82 \cdot 10^{-5}$	3.65	362.8	2.8	n. b.
10	730	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$2.69 \cdot 10^{-5}$	5.40	366.6	6.6	n. b.
10	740	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$3.63 \cdot 10^{-5}$	7.30	369.7	9.7	n. b.
10	750	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$4.55 \cdot 10^{-5}$	9.15	372.6	12.6	n. b.
10	760	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$5.36 \cdot 10^{-5}$	10.77	374.5	14.5	n. b.
10	770	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$6.32 \cdot 10^{-5}$	12.70	376.3	16.3	n. b.
10	780	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$7.09 \cdot 10^{-5}$	14.24	379.1	19.1	n. b.
20	800	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$8.56 \cdot 10^{-5}$	17.21	385.0	25	n. b.
20	820	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$1.02 \cdot 10^{-4}$	20.51	384.4	24.4	n. b.
20	840	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$1.16 \cdot 10^{-4}$	23.21	389.4	29.4	n. b.
40	880	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$1.43 \cdot 10^{-4}$	28.66	394.6	34.6	n. b.
40	920	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$1.68 \cdot 10^{-4}$	33.77	401.8	41.8	n. b.
40	960	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$1.90 \cdot 10^{-4}$	38.22	410.8	50.8	n. b.
80	1040	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$2.31 \cdot 10^{-4}$	46.32	431.6	71.6	n. b.
80	1120	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$2.65 \cdot 10^{-4}$	53.28	451.3	91.3	n. b.
100	1220	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$2.95 \cdot 10^{-4}$	59.38	471.5	111.5	n. b.
100	1320	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$3.28 \cdot 10^{-4}$	65.85	489.2	129.2	n. b.
100	1420	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$3.56 \cdot 10^{-4}$	71.36	498.3	138.3	n. b.

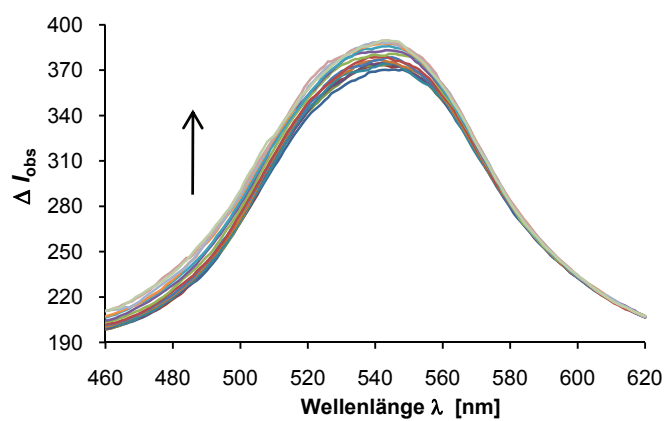
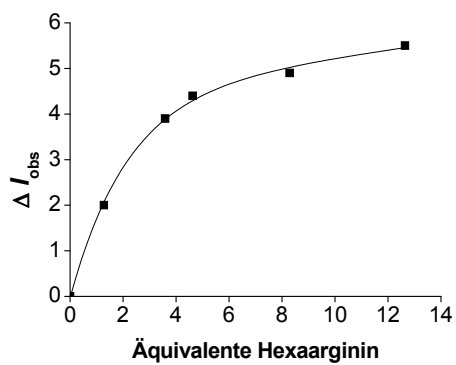
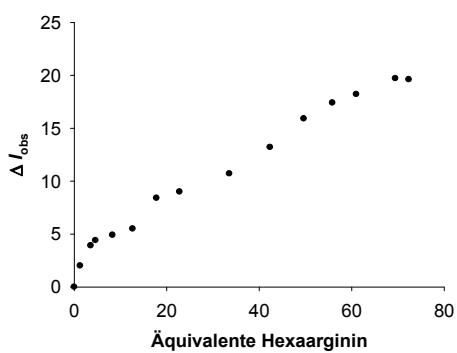
n. b. = nicht berechnet



**Hexaarginin:**  $c(\text{Arg}_6) = 6.41 \cdot 10^{-4} \text{ M}$      $c(\mathbf{12}) = 4.98 \cdot 10^{-6} \text{ M}$

Stöchiometrie: 1:1

$K_a = 1.05 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} (\pm 11 \%)$



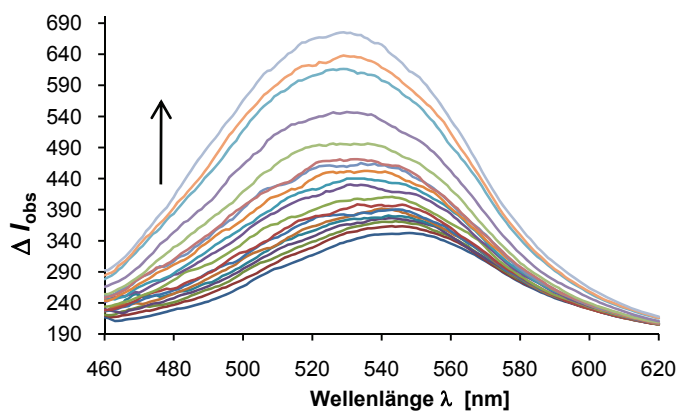
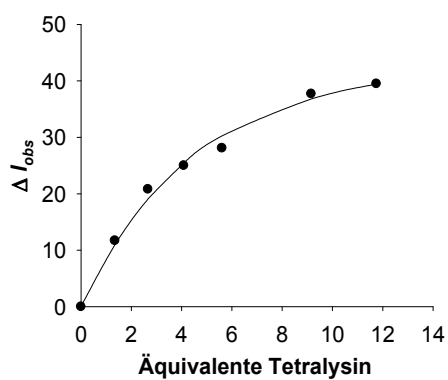
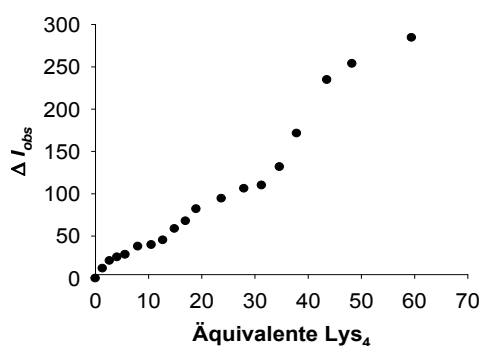
$V_{\text{Zugabe}}$ [ $\mu\text{L}$ ]	$V_{\text{gesamt}}$ [ $\mu\text{L}$ ]	[12] [M]	[Hexaarginin] [M]	[Hexaarginin] / [12]	$I_{544\text{nm}}$	$\Delta I_{\text{obs}}$	$\Delta I_{\text{calc}}$
0	700	$4.98 \cdot 10^{-6}$	0	0.00	370.0	0.0	0
10	710	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$6.36 \cdot 10^{-6}$	1.28	372.0	2.0	2.1
10	720	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$1.79 \cdot 10^{-5}$	3.59	373.9	3.9	3.9
10	730	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$2.30 \cdot 10^{-5}$	4.63	374.4	4.4	4.3
20	750	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$4.12 \cdot 10^{-5}$	8.29	374.9	4.9	5.0
30	780	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$6.92 \cdot 10^{-5}$	12.65	375.5	5.5	5.5
30	810	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$8.86 \cdot 10^{-5}$	17.81	378.4	8.4	n. b.
40	850	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$1.13 \cdot 10^{-4}$	22.78	379.0	9.0	n. b.
100	950	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$1.67 \cdot 10^{-4}$	33.56	380.7	10.7	n. b.
100	1050	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$2.11 \cdot 10^{-4}$	42.35	383.2	13.2	n. b.
100	1150	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$2.47 \cdot 10^{-4}$	49.66	385.9	15.9	n. b.
100	1250	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$2.78 \cdot 10^{-4}$	55.82	387.4	17.4	n. b.
100	1350	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$3.04 \cdot 10^{-4}$	61.00	388.2	18.2	n. b.
200	1450	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$3.46 \cdot 10^{-4}$	69.46	389.7	19.7	n. b.
100	1550	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$3.60 \cdot 10^{-4}$	72.36	389.6	19.6	n. b.

n. b. = nicht berechnet

**Tetralysin:**  $c(\text{Lys}_4) = 5.27 \cdot 10^{-4} \text{ M}$        $c(\mathbf{12}) = 4.98 \cdot 10^{-6} \text{ M}$

Stöchiometrie: 5:2

$K_a = 8.35 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} (\pm 14 \%)$



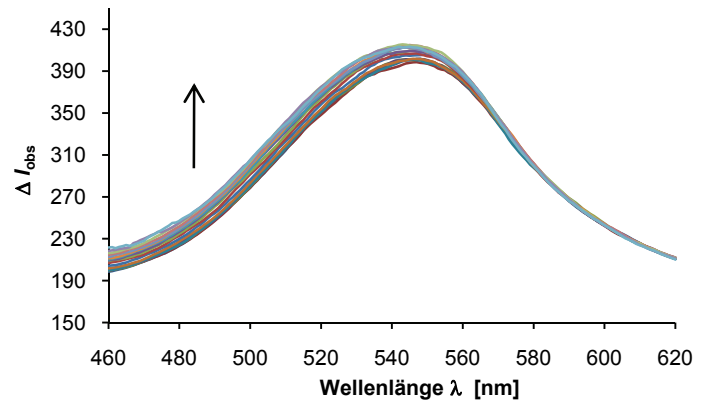
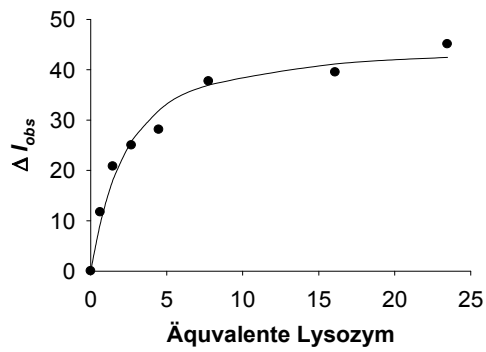
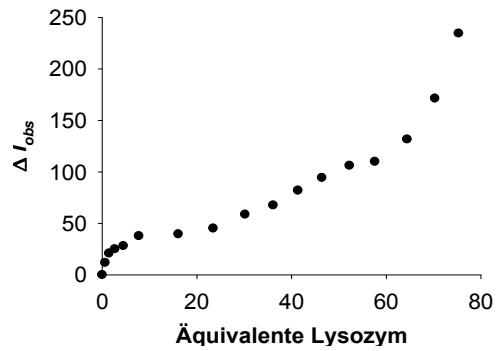
$V_{\text{Zugabe}}$ [μL]	$V_{\text{gesamt}}$ [μL]	[12] [M]	[Tetralysin] [M]	[Tetralysin] / [12]	$I_{544\text{nm}}$	$\Delta I_{\text{obs}}$	$\Delta I_{\text{calc}}$
0	700	$4.98 \cdot 10^{-6}$	0	0	350.9	0	0
10	710	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$6.71 \cdot 10^{-6}$	1.35	362.6	11.7	11.0
10	720	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$1.33 \cdot 10^{-5}$	2.67	371.7	20.8	19.1
10	730	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$2.03 \cdot 10^{-5}$	4.09	375.9	25.0	25.5
10	740	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$2.79 \cdot 10^{-5}$	5.61	379.0	28.1	30.3
20	760	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$4.56 \cdot 10^{-5}$	9.16	388.6	37.7	36.8
20	880	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$5.82 \cdot 10^{-5}$	11.75	390.4	39.5	39.4
20	900	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$6.32 \cdot 10^{-5}$	12.70	396.0	45.1	n. b.
20	920	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$7.40 \cdot 10^{-4}$	14.88	409.5	58.6	n. b.
20	940	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$8.44 \cdot 10^{-5}$	16.96	418.5	67.6	n. b.
20	960	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$9.43 \cdot 10^{-5}$	18.95	432.8	81.9	n. b.
50	1010	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$1.18 \cdot 10^{-4}$	23.69	445.2	94.3	n. b.
50	1060	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$1.39 \cdot 10^{-4}$	27.94	457.0	106.1	n. b.
50	1110	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$1.56 \cdot 10^{-4}$	31.25	460.8	109.9	n. b.
50	1160	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$1.72 \cdot 10^{-4}$	34.64	482.5	131.6	n. b.
50	1210	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$1.89 \cdot 10^{-4}$	37.85	522.2	171.3	n. b.
100	1310	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$2.17 \cdot 10^{-4}$	43.54	585.4	234.5	n. b.
100	1410	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$2.40 \cdot 10^{-4}$	48.26	604.4	253.5	n. b.
100	1510	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$2.96 \cdot 10^{-4}$	59.45	635.2	284.3	n. b.

n. b. = nicht berechnet

**Lysozym:**  $c(\text{Lysozym}) = 4.88 \cdot 10^{-4} \text{ M}$        $c(12) = 4.98 \cdot 10^{-6} \text{ M}$

Stöchiometrie: 1:1

$K_a = 1.25 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} (\pm 10 \%)$



$V_{\text{Zugabe}}$ [μL]	$V_{\text{gesamt}}$ [μL]	[12] [M]	[Lysozym] [M]	[Lysozym] / [12]	$I_{544\text{nm}}$	$\Delta I_{\text{obs}}$	$\Delta I_{\text{calc}}$
0	700	$4.98 \cdot 10^{-6}$	0	0	350.9	0	0
5	705	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$3.12 \cdot 10^{-6}$	0.63	362.6	11.7	1.5
5	710	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$7.24 \cdot 10^{-6}$	1.46	371.7	20.8	3.4
5	715	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$1.33 \cdot 10^{-5}$	2.68	375.9	25.0	6.2
10	725	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$2.23 \cdot 10^{-5}$	4.48	379.0	28.1	10.4
20	745	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$3.86 \cdot 10^{-5}$	7.76	388.6	37.7	18.0
50	795	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$8.00 \cdot 10^{-5}$	16.08	390.4	39.5	37.4
50	845	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$1.17 \cdot 10^{-4}$	23.47	396.0	45.1	54.5
50	895	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$1.50 \cdot 10^{-4}$	30.20	409.5	58.6	70.0
50	945	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$1.80 \cdot 10^{-4}$	36.12	418.5	67.6	n. b.
50	995	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$2.06 \cdot 10^{-4}$	41.36	432.8	81.9	n. b.
50	1045	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$2.31 \cdot 10^{-4}$	46.42	445.2	94.3	n. b.
70	1115	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$2.60 \cdot 10^{-4}$	52.26	457.0	106.1	n. b.
70	1185	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$2.87 \cdot 10^{-4}$	57.62	460.8	109.9	n. b.
100	1285	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$3.21 \cdot 10^{-4}$	64.44	482.5	131.6	n. b.
100	1385	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$3.50 \cdot 10^{-4}$	70.30	522.2	171.3	n. b.
100	1485	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$3.75 \cdot 10^{-4}$	75.33	585.4	234.5	n. b.

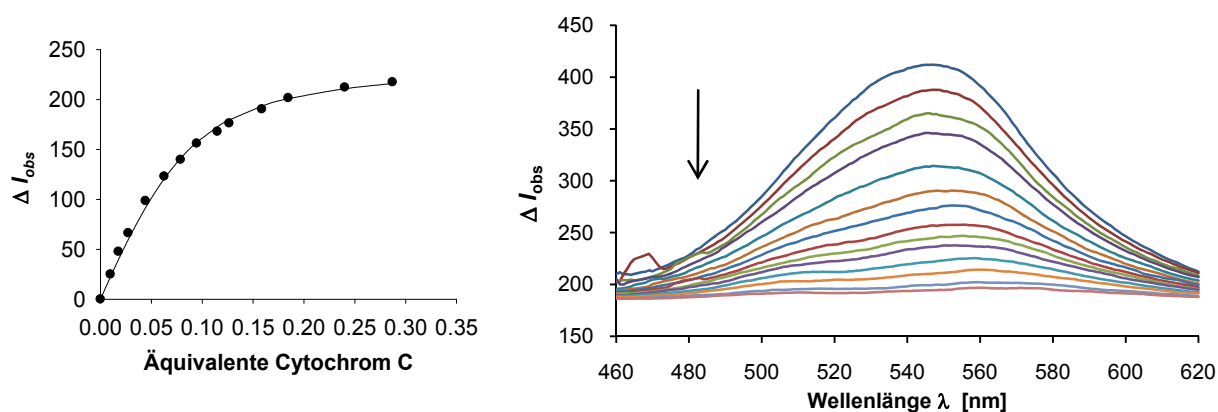
n.b. = nicht berechnet

**Cytochrom C:**  $c(\text{Cytochrom C}) = 6.92 \cdot 10^{-4} \text{ M}$

$c(\mathbf{12}) = 3.19 \cdot 10^{-4} \text{ M}$

Stöchiometrie: 1:10

$K_a = 9.41 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} (\pm 13 \%)$



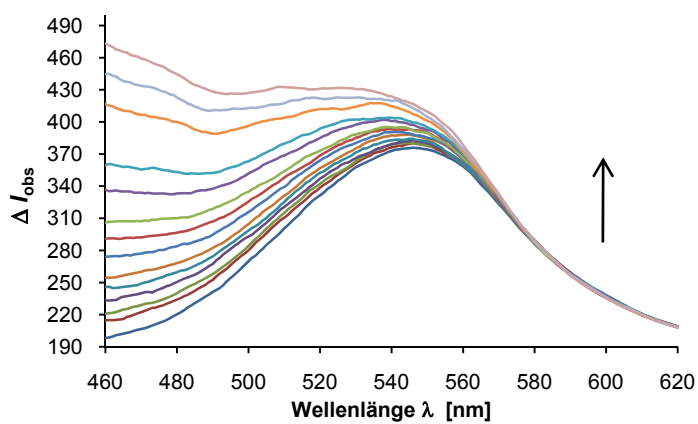
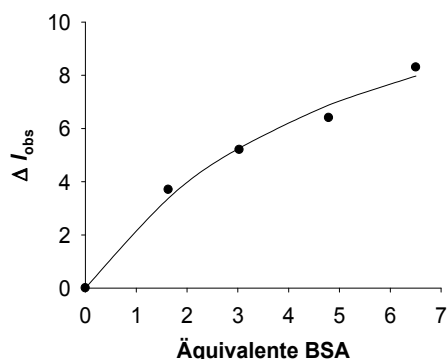
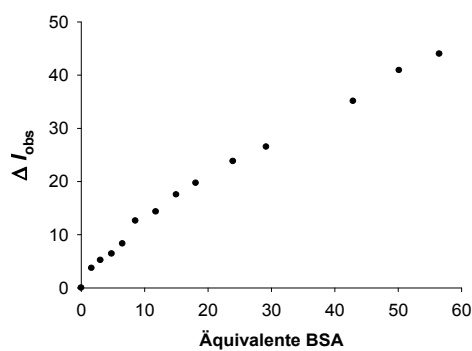
$V_{\text{Zugabe}}$ [μL]	$V_{\text{gesamt}}$ [μL]	[12] [M]	[Cytochrom C] [M]	[Cytochrom C] / [12]	$I_{544\text{nm}}$	$\Delta I_{\text{obs}}$	$\Delta I_{\text{calc}}$
0	700	$3.19 \cdot 10^{-4}$	0	0	411.5	0	0
5	705	$3.19 \cdot 10^{-4}$	$4.94 \cdot 10^{-6}$	0.02	386.7	24.8	20.0
5	710	$3.19 \cdot 10^{-4}$	$8.84 \cdot 10^{-6}$	0.03	363.9	47.6	35.4
5	715	$3.19 \cdot 10^{-4}$	$1.37 \cdot 10^{-5}$	0.04	345.3	66.2	53.9
10	725	$3.19 \cdot 10^{-4}$	$2.22 \cdot 10^{-5}$	0.07	313.1	98.4	84.9
10	735	$3.19 \cdot 10^{-4}$	$3.13 \cdot 10^{-5}$	0.10	288.5	123.0	115.2
10	745	$3.19 \cdot 10^{-4}$	$3.94 \cdot 10^{-5}$	0.12	271.8	139.7	137.9
10	755	$3.19 \cdot 10^{-4}$	$4.73 \cdot 10^{-5}$	0.15	255.6	155.9	156.2
10	765	$3.19 \cdot 10^{-4}$	$5.75 \cdot 10^{-5}$	0.18	243.6	167.9	174.2
10	775	$3.19 \cdot 10^{-4}$	$6.33 \cdot 10^{-5}$	0.20	235.4	176.1	181.8
20	795	$3.19 \cdot 10^{-4}$	$7.93 \cdot 10^{-5}$	0.25	221.2	190.3	196.3
20	815	$3.19 \cdot 10^{-4}$	$9.23 \cdot 10^{-5}$	0.29	210.0	201.5	203.4
40	855	$3.19 \cdot 10^{-4}$	$1.20 \cdot 10^{-4}$	0.38	199.4	212.1	212.1
40	895	$3.19 \cdot 10^{-4}$	$1.44 \cdot 10^{-4}$	0.45	194.2	217.3	216.0

**BSA:**  $c(\text{BSA}) = 7.21 \cdot 10^{-4} \text{ M}$

$c(\mathbf{12}) = 4.98 \cdot 10^{-6} \text{ M}$

Stöchiometrie: 1:1

$K_a = 4.78 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} (\pm 15 \%)$





$V_{\text{Zugabe}}$ [μL]	$V_{\text{gesamt}}$ [μL]	[12] [M]	[BSA] [M]	[BSA] / [12]	$I_{544\text{nm}}$	$\Delta I_{\text{obs}}$	$\Delta I_{\text{calc}}$
0	700	$4.98 \cdot 10^{-6}$	0	0	375.2	0	0
10	710	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$8.12 \cdot 10^{-6}$	1.63	378.9	3.7	2.2
5	715	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$1.51 \cdot 10^{-5}$	3.03	380.4	5.2	4.0
10	725	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$2.38 \cdot 10^{-5}$	4.79	381.6	6.4	6.2
10	735	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$3.24 \cdot 10^{-5}$	6.51	383.5	8.3	8.2
10	745	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$4.25 \cdot 10^{-5}$	8.55	387.8	12.6	n. b.
20	765	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$5.85 \cdot 10^{-5}$	11.76	389.5	14.3	n. b.
20	785	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$7.46 \cdot 10^{-5}$	14.99	392.7	17.5	n. b.
20	805	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$8.99 \cdot 10^{-5}$	18.07	394.9	19.7	n. b.
40	845	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$1.19 \cdot 10^{-4}$	23.95	399.0	23.8	n. b.
40	885	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$1.45 \cdot 10^{-4}$	29.19	401.7	26.5	n. b.
120	1005	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$2.13 \cdot 10^{-4}$	42.90	410.3	35.1	n. b.
80	1085	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$2.49 \cdot 10^{-4}$	50.14	416.1	40.9	n. b.
80	1165	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$2.81 \cdot 10^{-4}$	56.50	419.2	44.0	n. b.

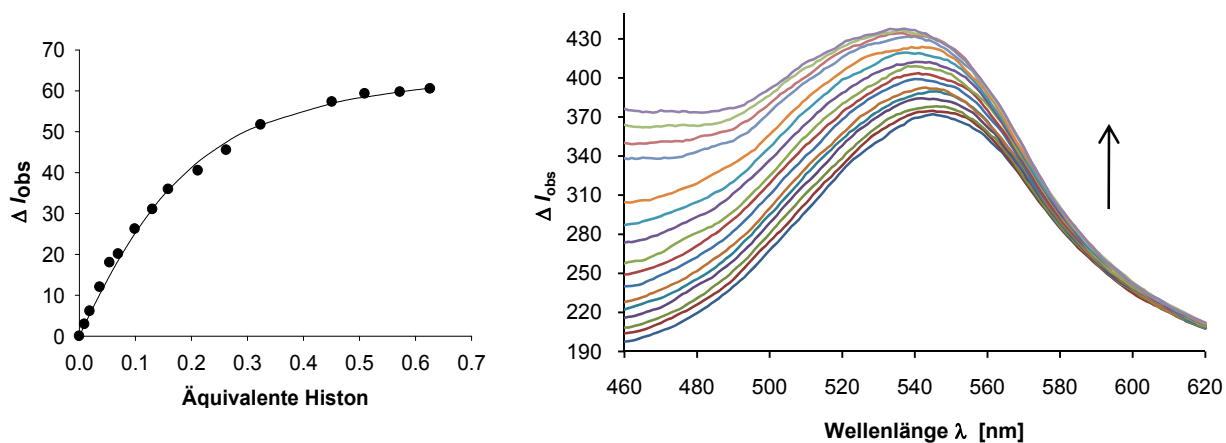
n. b. = nicht berechnet

**Histon H3:**  $c(\text{Histon H3}) = 6.57 \cdot 10^{-4} \text{ M}$

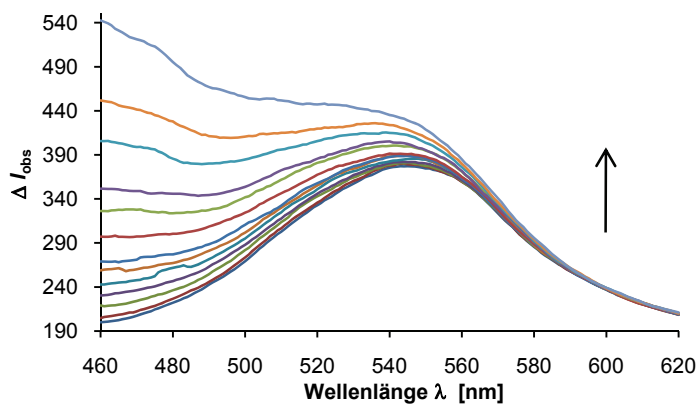
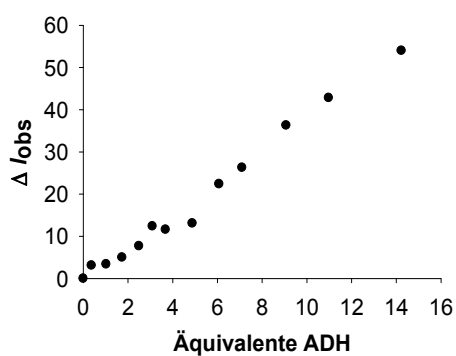
$c(\mathbf{12}) = 4.98 \cdot 10^{-4} \text{ M}$

Stöchiometrie: 1:6

$K_a = 2.95 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} (\pm 12 \%)$



$V_{\text{Zugabe}}$ [ $\mu\text{L}$ ]	$V_{\text{gesamt}}$ [ $\mu\text{L}$ ]	[12] [M]	[Histon H3] [M]	[Histon H3] / [12]	$I_{544\text{nm}}$	$\Delta I_{\text{obs}}$	$\Delta I_{\text{calc}}$
0	700	$4.98 \cdot 10^{-4}$	0	0	371.6	0	0
5	705	$4.98 \cdot 10^{-4}$	$4.65 \cdot 10^{-6}$	0.01	374.5	2.9	2.7
5	710	$4.98 \cdot 10^{-4}$	$9.24 \cdot 10^{-6}$	0.02	377.7	6.1	5.3
10	720	$4.98 \cdot 10^{-4}$	$1.82 \cdot 10^{-5}$	0.04	383.6	12.0	10.3
10	730	$4.98 \cdot 10^{-4}$	$2.69 \cdot 10^{-5}$	0.05	389.6	18.0	14.8
10	740	$4.98 \cdot 10^{-4}$	$3.46 \cdot 10^{-5}$	0.07	391.7	20.1	18.5
20	760	$4.98 \cdot 10^{-4}$	$4.93 \cdot 10^{-5}$	0.10	397.8	26.2	25.1
20	780	$4.98 \cdot 10^{-4}$	$6.49 \cdot 10^{-5}$	0.13	402.6	31.0	31.1
20	800	$4.98 \cdot 10^{-4}$	$7.90 \cdot 10^{-5}$	0.16	407.5	35.9	35.8
40	840	$4.98 \cdot 10^{-4}$	$1.05 \cdot 10^{-4}$	0.21	412.1	40.5	42.6
40	880	$4.98 \cdot 10^{-4}$	$1.31 \cdot 10^{-4}$	0.26	417.1	45.5	47.4
60	940	$4.98 \cdot 10^{-4}$	$1.61 \cdot 10^{-4}$	0.32	423.3	51.7	51.6
140	1080	$4.98 \cdot 10^{-4}$	$2.24 \cdot 10^{-4}$	0.45	428.9	57.3	56.9
80	1160	$4.98 \cdot 10^{-4}$	$2.53 \cdot 10^{-4}$	0.51	430.9	59.3	58.5
100	1260	$4.98 \cdot 10^{-4}$	$2.85 \cdot 10^{-4}$	0.57	431.3	59.7	59.8
100	1360	$4.98 \cdot 10^{-4}$	$3.12 \cdot 10^{-4}$	0.63	432.1	60.5	60.7

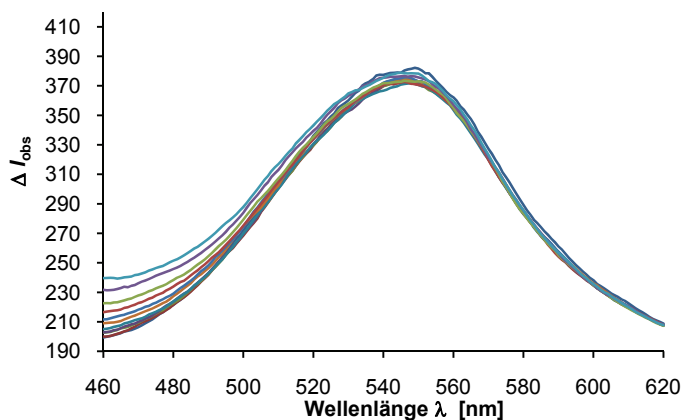
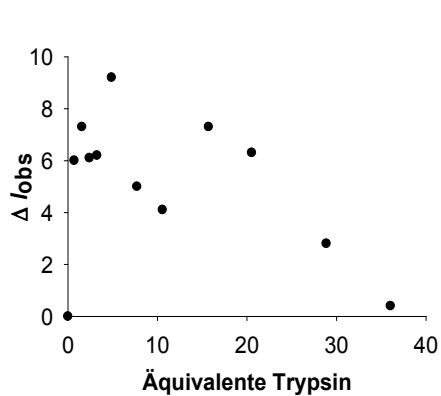
ADH:  $c(\text{ADH}) = 2.59 \cdot 10^{-4} \text{ M}$  $c(\mathbf{12}) = 4.98 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ 

$V_{\text{Zugabe}}$ [ $\mu\text{L}$ ]	$V_{\text{gesamt}}$ [ $\mu\text{L}$ ]	[ $\mathbf{12}$ ] [M]	[ADH] [M]	[ADH] / [ $\mathbf{12}$ ]	$I_{544\text{nm}}$	$\Delta I_{\text{obs}}$	$\Delta I_{\text{calc}}$
0	700	$4.98 \cdot 10^{-6}$	0	0	377.0	0	n. b.
5	705	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$1.85 \cdot 10^{-6}$	0.37	380.1	3.1	n. b.
10	715	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$5.10 \cdot 10^{-6}$	1.03	380.4	3.4	n. b.
10	725	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$8.63 \cdot 10^{-6}$	1.73	382.0	5.0	n. b.
10	735	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$1.24 \cdot 10^{-5}$	2.49	384.7	7.7	n. b.
10	745	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$1.54 \cdot 10^{-5}$	3.09	389.4	12.4	n. b.
10	755	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$1.83 \cdot 10^{-5}$	3.68	388.6	11.6	n. b.
20	775	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$2.43 \cdot 10^{-5}$	4.88	390.1	13.1	n. b.
20	795	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$3.02 \cdot 10^{-5}$	6.08	399.4	22.4	n. b.
20	815	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$3.53 \cdot 10^{-5}$	7.10	403.3	26.3	n. b.
40	855	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$4.51 \cdot 10^{-5}$	9.07	413.3	36.3	n. b.
40	895	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$5.46 \cdot 10^{-5}$	10.97	419.8	42.8	n. b.
80	975	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$7.08 \cdot 10^{-5}$	14.23	431.0	54.0	n. b.

n. b. = nicht berechnet

Trypsin c (Trypsin) =  $6.07 \cdot 10^{-4}$  M

c (12) =  $4.98 \cdot 10^{-6}$  M



V <sub>Zugabe</sub> [μL]	V <sub>gesamt</sub> [μL]	[12] [M]	[Trypsin] [M]	[Trypsin] / [12]	I <sub>544nm</sub>	Δ I <sub>obs</sub>	Δ I <sub>calc</sub>
0	700	$4.98 \cdot 10^{-6}$	0	0	379.0	0	n. b.
5	705	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$3.46 \cdot 10^{-6}$	0.70	373.0	6.0	n. b.
5	710	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$7.74 \cdot 10^{-6}$	1.56	371.7	7.3	n. b.
5	715	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$1.20 \cdot 10^{-5}$	2.40	372.9	6.1	n. b.
5	720	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$1.61 \cdot 10^{-5}$	3.24	372.8	6.2	n. b.
10	730	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$2.43 \cdot 10^{-5}$	4.88	369.8	9.2	n. b.
20	750	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$3.84 \cdot 10^{-5}$	7.71	374.0	5.0	n. b.
20	770	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$5.25 \cdot 10^{-5}$	10.56	374.9	4.1	n. b.
40	810	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$7.82 \cdot 10^{-5}$	15.71	371.7	7.3	n. b.
40	850	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$1.02 \cdot 10^{-4}$	20.53	372.7	6.3	n. b.
80	930	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$1.44 \cdot 10^{-4}$	28.87	376.2	2.8	n. b.
80	1010	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$1.79 \cdot 10^{-4}$	36.03	378.6	0.4	n. b.

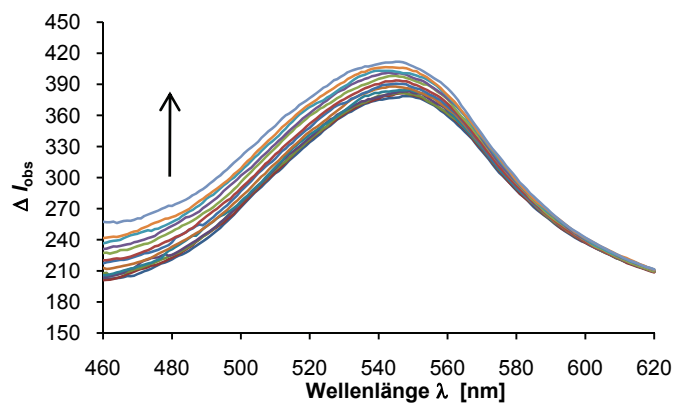
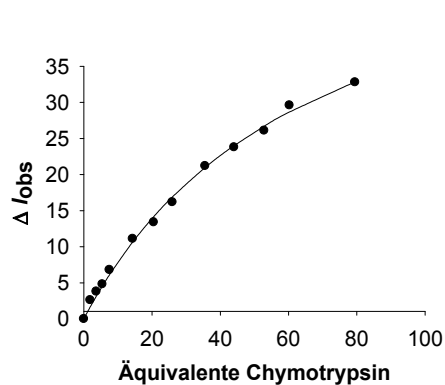
n. b. = nicht berechnet

**Chymotrypsin:**  $c(\text{Chymotrypsin}) = 7.24 \cdot 10^{-4} \text{ M}$

$c(\mathbf{12}) = 4.98 \cdot 10^{-6} \text{ M}$

Stöchiometrie: 1:1

$K_a = 3.05 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} (\pm 9 \%)$



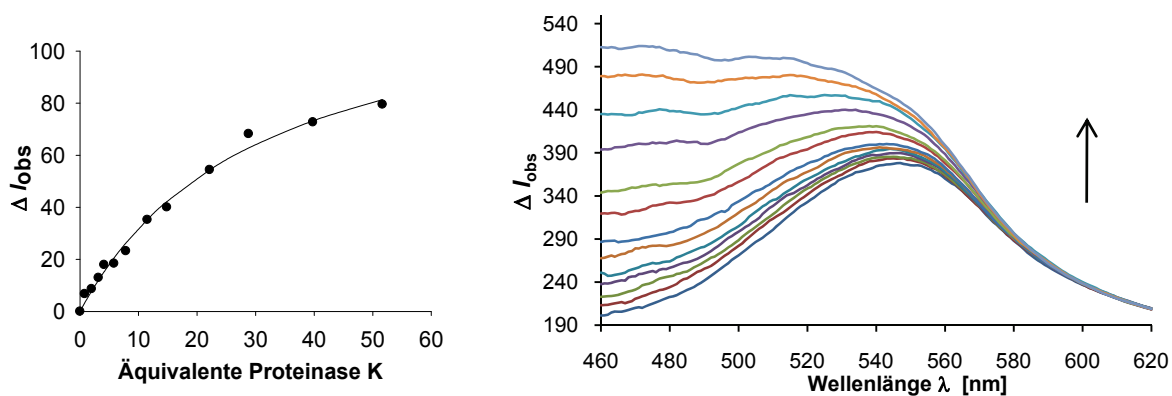
$V_{\text{Zugabe}}$ [μL]	$V_{\text{gesamt}}$ [μL]	[12] [M]	[Chymotrypsin] [M]	[Chymotrypsin] / [12]	$I_{544\text{nm}}$	$\Delta I_{\text{obs}}$	$\Delta I_{\text{calc}}$
0	700	$4.98 \cdot 10^{-6}$	0	0.00	376.8	0	0
10	710	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$9.24 \cdot 10^{-6}$	1.86	379.4	2.6	1.6
10	720	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$1.82 \cdot 10^{-5}$	3.67	380.6	3.8	3.1
10	730	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$2.70 \cdot 10^{-5}$	5.43	381.6	4.8	4.5
10	740	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$3.75 \cdot 10^{-5}$	7.53	383.6	6.8	6.1
40	780	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$7.12 \cdot 10^{-5}$	14.32	387.9	11.1	10.6
40	820	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$1.02 \cdot 10^{-4}$	20.47	390.2	13.4	14.2
40	860	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$1.29 \cdot 10^{-4}$	25.93	393.0	16.2	16.9
80	940	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$1.77 \cdot 10^{-4}$	35.53	398.0	21.2	21.0
80	1020	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$2.19 \cdot 10^{-4}$	44.02	400.6	23.8	24.0
100	1120	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$2.63 \cdot 10^{-4}$	52.84	402.9	26.1	26.7
100	1220	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$3.00 \cdot 10^{-4}$	60.25	406.4	29.6	28.7
300	1520	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$3.95 \cdot 10^{-4}$	79.45	409.6	32.8	32.8

**Proteinase K:**  $c(\text{Proteinase K}) = 7.03 \cdot 10^{-4} \text{ M}$

$c(\mathbf{12}) = 4.98 \cdot 10^{-6} \text{ M}$

Stöchiometrie: 1:1

$K_a = 6.74 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} (\pm 12 \%)$



$V_{\text{Zugabe}}$ [ $\mu\text{L}$ ]	$V_{\text{gesamt}}$ [ $\mu\text{L}$ ]	[ $\mathbf{12}$ ] [M]	[Proteinase K] [M]	[Proteinase K] / [ $\mathbf{12}$ ]	$I_{544\text{nm}}$	$\Delta I_{\text{obs}}$	$\Delta I_{\text{calc}}$
0	700	$4.98 \cdot 10^{-6}$	0	0	376.7	0	0
5	705	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$4.00 \cdot 10^{-6}$	0.80	383.4	6.7	3.3
5	710	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$9.91 \cdot 10^{-6}$	1.99	385.3	8.6	7.8
5	715	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$1.57 \cdot 10^{-5}$	3.16	389.6	12.9	12.0
5	720	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$2.05 \cdot 10^{-5}$	4.12	394.6	17.9	15.3
10	730	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$2.89 \cdot 10^{-5}$	5.81	395.1	18.4	20.5
10	740	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$3.89 \cdot 10^{-5}$	7.82	399.9	23.2	26.2
20	760	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$5.72 \cdot 10^{-5}$	11.51	411.9	35.2	35.3
20	780	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$7.38 \cdot 10^{-5}$	14.83	416.7	40.0	42.2
50	830	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$1.10 \cdot 10^{-4}$	22.15	431.1	54.4	54.3
50	880	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$1.43 \cdot 10^{-4}$	28.80	444.9	68.2	62.8
100	980	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$1.98 \cdot 10^{-4}$	39.78	449.4	72.7	73.2
100	1080	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$2.57 \cdot 10^{-4}$	51.66	456.2	79.5	81.4

### 5.7. ITC-Messungen (Isotherme Titrationskalorimetrie)

In der vorliegenden Arbeit wurde auch versucht ITC-Messungen zwischen Proteinen und dem synthetisierten und in Liposomen eingelagerten Rezeptorlipid **11** durchzuführen. Verdünnungstitrationen mit den Liposomen (sowohl Liposomen in Puffer, als auch Puffer zu Liposomen) zeigten keinen Effekte (Enthalpieänderung). Auch Verdünnungstitrationen mit den Proteinen zeigten keine Effekte. Die zwischen Protein und Liposomen erhaltenen Enthalpiediagramme konnten jedoch nicht ausgewertet werden. Es könnte sein, dass die BP-Rezeptoreinheiten an unterschiedlichen Stellen des Proteins binden und so nicht jedes Bindungsereignis über die gleiche Stärke und damit die gleiche Wärmetönung verfügt.

## 6. Literaturverzeichnis

- [1] L. Schmitt, R. Tampé, in *Prot. Eng.*, Oxford Univ Press UK, **1995**, pp. 121.
- [2] G. Klenkar, R. Valiokas, I. Lundström, A. Tinazli, R. Tampé, J. Piehler, B. Liedberg, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 3643.
- [3] H. Zhu, M. Snyder, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 55.
- [4] G. MacBeath, *Nature Genetics* **2002**, *32*, 526.
- [5] Y. S. Lee, M. Mrksich, *Trends Biotechnol.* **2002**, *20*, S14.
- [6] G. MacBeath, S. L. Schreiber, *Science* **2000**, *289*, 1760.
- [7] P. Maury, M. Escalante, M. Peter, D. N. Reinhoudt, V. Subramaniam, J. Huskens, *Small* **2007**, *3*, 1584.
- [8] M. Schaeferling, S. Schiller, H. Paul, M. Kruschina, P. Pavlickova, M. Meerkamp, C. Giammasi, D. Kambhampati, *Electrophoresis* **2002**, *23*, 3097.
- [9] M. M. C. Cheng, G. Cuda, Y. L. Bunimovich, M. Gaspari, J. R. Heath, H. D. Hill, C. A. Mirkin, A. J. Nijdam, R. Terracciano, T. Thundat, M. Ferrari, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 11.
- [10] E. D. Goluch, S. I. Stoeva, J. S. Lee, K. A. Shaikh, C. A. Mirkin, C. Liu, *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24*, 2397.
- [11] J. LaBaer, N. Ramachandran, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 14.
- [12] J. Yin, F. Liu, X. H. Li, C. T. Walsh, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7754.
- [13] E. Phizicky, P. I. H. Bastiaens, H. Zhu, M. Snyder, S. Fields, *Nature* **2003**, *422*, 208.
- [14] S. Y. Seong, C. Y. Choi, *Proteomics* **2003**, *3*, 2176.
- [15] G. M. Whitesides, *Small* **2005**, *1*, 172.
- [16] C. Renner, J. Piehler, T. Schrader, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 620.
- [17] B. A. Rosenzweig, N. T. Ross, D. M. Tagore, J. Jayawickramarajah, I. Saraogi, A. D. Hamilton, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 5020.
- [18] K. H. Choi, A. D. Hamilton, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 10241.
- [19] H. S. Park, Q. Lin, A. D. Hamilton, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 8.
- [20] C. C. You, M. De, G. Han, V. M. Rotello, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12873.
- [21] N. O. Fischer, C. M. McIntosh, J. M. Simard, V. M. Rotello, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 5018.
- [22] E. N. Savariar, M. M. Sochat, A. Klaikherd, S. Thayumanavan, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 110.
- [23] C. C. You, O. R. Miranda, B. Gider, P. S. Ghosh, I. B. Kim, B. Erdogan, S. A. Krovi, U. H. F. Bunz, V. M. Rotello, *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2*, 318.
- [24] B. S. Sandanaraj, H. Bayraktar, K. Krishnamoorthy, M. J. Knapp, S. Thayumanavan, *Langmuir* **2007**, *23*, 3891.
- [25] A. Tinazli, J. L. Tang, R. Valiokas, S. Picuric, S. Lata, J. Piehler, B. Liedberg, R. Tampé, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 5249.
- [26] M. Mrksich, C. S. Chen, Y. N. Xia, L. E. Dike, D. E. Ingber, G. M. Whitesides, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 10775.
- [27] S. Lata, J. Piehler, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 1096.
- [28] R. Valiokas, G. Klenkar, A. Tinazli, R. Tampé, B. Liedberg, J. Piehler, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1325.
- [29] K. Busch, R. Tampé, *J. Biotechnol.* **2001**, *82*, 3.
- [30] M. Gavutis, S. Lata, P. Lamken, P. Muller, J. Piehler, *Biophys. J.* **2005**, *88*, 4289.



- [31] P. Lamken, S. Lata, M. Gavutis, J. Piehler, *J. Mol. Biol.* **2004**, *341*, 303.
- [32] R. Valiokas, G. Klenkar, A. Tinazli, A. Reichel, R. Tampé, J. Piehler, B. Liedberg, *Langmuir* **2008**, *24*, 4959.
- [33] T. Andre, A. Reichel, K. H. Wiesmüller, R. Tampé, J. Piehler, R. Brock, *ChemBiochem* **2009**, *10*, 1878.
- [34] S. Lata, A. Reichel, R. Brock, R. Tampé, J. Piehler, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10205.
- [35] X. Jiang, A. Zuber, J. Heberle, K. Ataka, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2008**, *10*, 6381.
- [36] M. L. Lesaichere, M. Uttamchandani, G. Y. J. Chen, S. Q. Yao, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 2079.
- [37] N. Bischler, F. Balavoine, P. Milkereit, H. Tschochner, C. Mioskowski, P. Schultz, *Biophys. J.* **1998**, *74*, 1522.
- [38] P. D. Gershon, S. Khilko, *J. Immunol. Method.* **1995**, *183*, 65.
- [39] E. V. Amirgoulova, J. Groll, C. D. Heyes, T. Ameringer, C. Rocker, M. Moller, G. U. Nienhaus, *ChemPhysChem* **2004**, *5*, 552.
- [40] S. A. Sandberg, R. W. Barrett, M. Pirrung, A. L. Lu, B. Kiangsoontra, C. P. Holmes, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 12050.
- [41] A. J. Chmura, M. S. Orton, C. F. Meares, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 8480.
- [42] T. Kodadek, *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 105.
- [43] R. M. T. de Wildt, C. R. Mundy, B. D. Gorick, I. M. Tomlinson, *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 989.
- [44] S. W. Lee, B. K. Oh, R. G. Sanedrin, K. Salaita, T. Fujigaya, C. A. Mirkin, *Adv. Mater.* **2006**, *18*, 1133.
- [45] G. H. Degenhart, B. Dordi, H. Schönherr, G. J. Vancso, *Langmuir* **2004**, *20*, 6216.
- [46] H. B. Yin, T. Brown, J. S. Wilkinson, R. W. Eason, T. Melvin, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*.
- [47] T. Zheng, D. Peelen, L. M. Smith, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 9982.
- [48] K. Johanson, E. Appelbaum, M. Doyle, P. Hensley, B. Zhao, S. S. Abdelmeguid, P. Young, R. Cook, S. Carr, R. Matico, D. Cusimano, E. Dul, M. Angelichio, I. Brooks, E. Winborne, P. McDonnell, T. Morton, D. Bennett, T. Sokoloski, D. McNulty, M. Rosenberg, I. Chaiken, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 9459.
- [49] J. A. Camarero, Y. Kwon, M. A. Coleman, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 14730.
- [50] A. Girish, H. Y. Sun, D. S. Y. Yeo, G. Y. J. Chen, T. K. Chua, S. Q. Yao, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 2447.
- [51] E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science* **2000**, *287*, 2007.
- [52] A. Watzke, M. Kohn, M. Gutierrez-Rodriguez, R. Wacker, H. Schroder, R. Breinbauer, J. Kuhlmann, K. Alexandrov, C. M. Niemeyer, R. S. Goody, H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1408.
- [53] A. D. de Araujo, J. M. Palomo, J. Cramer, M. Kohn, H. Schroder, R. Wacker, C. Niemeyer, K. Alexandrov, H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 296.
- [54] P. C. Lin, S. H. Ueng, M. C. Tseng, J. L. Ko, K. T. Huang, S. C. Yu, A. K. Adak, Y. J. Chen, C. C. Lin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4286.
- [55] C. Gauchet, G. R. Labadie, C. D. Poulter, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9274.
- [56] B. P. Duckworth, J. H. Xu, T. A. Taton, A. Guo, M. D. Distefano, *Bioconj. Chem.* **2006**, *17*, 967.

- [57] Y. P. Kim, W. L. Daniel, Z. Y. Xia, H. X. Xie, C. A. Mirkin, J. H. Rao, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 76.
- [58] C. D. Hodneland, Y. S. Lee, D. H. Min, M. Mrksich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 5048.
- [59] Y. Kwon, M. A. Coleman, J. A. Camarero, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 1726.
- [60] J. A. Camarero, *Biopolymers* **2008**, 90, 450.
- [61] J. Piehler, A. Brecht, K. E. Geckeler, G. Gauglitz, *Biosens. Bioelectron.* **1996**, 11, 579.
- [62] J. Piehler, A. Brecht, R. Valiokas, B. Liedberg, G. Gauglitz, *Biosens. Bioelectron.* **2000**, 15, 473.
- [63] G. Elender, M. Kuhner, E. Sackmann, *Biosens. Bioelectron.* **1996**, 11, 565.
- [64] M. Kühner, R. Tampé, E. Sackmann, *Biophys. J.* **1994**, 67, 217.
- [65] S. Rensing, M. Arendt, A. Springer, T. Grawe, T. Schrader, *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 5814.
- [66] S. J. Koch, C. Renner, X. L. Xie, T. Schrader, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 6352.
- [67] M. Mammen, S. K. Choi, G. M. Whitesides, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 2755.
- [68] C. Dietrich, O. Boscheinen, K. D. Scharf, L. Schmitt, R. Tampé, *Biochemistry* **1996**, 35, 1100.
- [69] E. Hochuli, W. Bannwarth, H. Döbelin, R. Gentz, D. Stüber, *Nat. Biotechnol.* **1988**, 6, 1321.
- [70] E. Hochuli, *Genet. Eng.* **1990**, 12, 87.
- [71] T. G. M. Schmidt, A. Skerra, *Prot. Eng.* **1993**, 6, 109.
- [72] L. Schmitt, C. Dietrich, R. Tampé, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 8485.
- [73] C. Dietrich, L. Schmitt, R. Tampé, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 9014.
- [74] U. Rädler, J. Mack, N. Persike, G. Jung, R. Tampé, *Biophys. J.* **2000**, 79, 3144.
- [75] I. T. Dorn, K. Pawlitschko, S. C. Pettinger, R. Tampé, *Biol. Chem.* **1998**, 379, 1151.
- [76] I. T. Dorn, R. Eschrich, E. Seemüller, R. Guckenberger, R. Tampé, *J. Mol. Biol.* **1999**, 288, 1027.
- [77] S. Lata, M. Gavutis, R. Tampé, J. Piehler, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 2365.
- [78] S. Lata, M. Gavutis, J. Piehler, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 6.
- [79] S. Lata, J. Piehler, *Nat. Prot.* **2006**, 1, 2104.
- [80] M. Gavutis, S. Lata, J. Piehler, *Nat. Prot.* **2006**, 1, 2091.
- [81] H. M. Haake, A. Schütz, G. Gauglitz, *Fresenius J. Anal. Chem.* **2000**, 366, 576.
- [82] T. Kawaguchi, T. Shiro, K. Iwata, *Thin Solid Films* **1990**, 191, 369.
- [83] A. Brecht, G. Gauglitz, J. Polster, *Biosens. Bioelectron.* **1993**, 8, 387.
- [84] J. Piehler, A. Brecht, T. Giersch, B. Hock, G. Gauglitz, *J. Immunol. Methods* **1997**, 201, 189.
- [85] A. Huber, S. Demartis, D. Neri, *J. Mol. Recognit.* **1999**, 12, 198.
- [86] T. D. Bartley, R. W. Hunt, A. A. Welcher, W. J. Boyle, V. P. Parker, R. A. Lindberg, H. S. Lu, A. M. Colombero, R. L. Elliott, B. A. Guthrie, P. L. Holst, J. D. Skrine, R. J. Toso, M. Zhang, E. Fernandez, G. Trail, B. Varnum, Y. Yarden, T. Hunter, G. M. Fox, *Nature* **1994**, 368, 558.
- [87] J. Piehler, A. Brecht, G. Gauglitz, *Anal. Chem.* **1996**, 68, 139.

- [88] T. Rakickas, M. Gavutis, A. Reichel, J. Piehler, B. Liedberg, R. Valiokas, *Nano Lett.* **2008**, 8, 3369.
- [89] D. M. Tagore, K. I. Sprinz, S. Fletcher, J. Jayawickramarajah, A. D. Hamilton, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 223.
- [90] J. Piehler, A. Brecht, G. Gauglitz, M. Zerlin, C. Maul, R. Thiericke, S. Grabley, *Anal. Biochem.* **1997**, 249, 94.
- [91] B. P. Möhrle, M. Kumpf, G. N. Gauglitz, *Analyst* **2005**, 130, 1634.
- [92] F. Pröll, B. Möhrle, M. Kumpf, G. Gauglitz, *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, 282, 1889.
- [93] J. Piehler, A. Brecht, G. Gauglitz, C. Maul, S. Grabley, M. Zerlin, *Biosens. Bioelectron.* **1997**, 12, 531.
- [94] W. Lukosz, *Biosens. Bioelectron.* **1991**, 6, 215.
- [95] H. J. Trurnit, *Arch. Biochem. Biophys.* **1953**, 47, 251.
- [96] J. R. Adams, K. K. Rao, N. M. Bashara, *J. Metals* **1969**, 21, A127.
- [97] C. Striebel, A. Brecht, G. Gauglitz, *Biosens. Bioelectron.* **1994**, 9, 139.
- [98] A. C. Hall, *Surface Sci.* **1969**, 16, 1.
- [99] M. C. Howland, A. W. Szmodis, B. Sanii, A. N. Parikh, *Biophys. J.* **2007**, 92, 1306.
- [100] B. Liedberg, C. Nylander, I. Lundström, *Sens. Actuators* **1983**, 4, 299.
- [101] M. Kasper, S. Busche, F. Dieterle, G. Belge, G. Gauglitz, *Meas. Sci. Technol.* **2004**, 15, 540.
- [102] C. Hänel, G. Gauglitz, *Anal. Bioanal. Chem.* **2002**, 372, 91.
- [103] D. J. O'Shannessy, M. Brigham-Burke, K. K. Soneson, P. Hensley, I. Brooks, *Anal. Biochem.* **1993**, 212, 457.
- [104] U. Jonsson, L. Fagerstam, B. Ivarsson, B. Johnsson, R. Karlsson, K. Lundh, S. Löfas, B. Persson, H. Roos, I. Rönnerberg, S. Sjölander, E. Stenberg, R. Stahlberg, C. Urbaniczky, H. Ostlin, M. Malmqvist, *Biotechniques* **1991**, 11, 620.
- [105] S. Löfas, M. Malmqvist, I. Rönnerberg, E. Stenberg, B. Liedberg, I. Lundström, *Sens. Actuators B-Chem.* **1991**, 5, 79.
- [106] H. M. Schmitt, A. Brecht, J. Piehler, G. Gauglitz, *Biosens. Bioelectron.* **1997**, 12, 809.
- [107] P. M. Nellen, W. Lukosz, *Sens. Actuator B-Chem.* **1990**, 1, 592.
- [108] J. Vörös, J. J. Ramsden, G. Csúcs, I. Szendro, S. M. De Paul, M. Textor, N. D. Spencer, *Biomaterials* **2002**, 23, 3699.
- [109] J. Piehler, A. Brandenburg, A. Brecht, E. Wagner, G. Gauglitz, *Appl. Optics* **1997**, 36, 6554.
- [110] D. Hönig, D. Möbius, *J. Phys. Chem.* **1991**, 95, 4590.
- [111] U. Stange, M. G. Hutchins, N. Groome, L. Tarassenko, *Biomaterials* **1988**, 9, 58.
- [112] R. Cush, J. M. Cronin, W. J. Stewart, C. H. Maule, J. Molloy, N. J. Goddard, *Biosens. Bioelectron.* **1993**, 8, 347.
- [113] R. W. Watkins, C. R. Robertson, *J. Biomed. Mater. Res.* **1977**, 11, 915.
- [114] J. Tschmelak, N. Käppel, G. Gauglitz, *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, 382, 1895.
- [115] D. Axelrod, T. P. Burghardt, N. L. Thomson *Ann. Rev. Biophys. Bioeng* **1984**, 13, 247.
- [116] B. Lassen, M. Malmsten, *J. Coll. Interf. Sci.* **1996**, 179, 470.
- [117] J. J. Ramsden, P. Schneider, *Biochemistry* **1993**, 32, 523.
- [118] H. M. McConnell, T. H. Watts, R. M. Weis, A. A. Brian, *Biochim. Biophys. Acta* **1986**, 864, 95.

- [119] G. Gauglitz, A. Brecht, G. Kraus, W. Nahm, *Sens. Actuators B-Chem.* **1993**, 11, 21.
- [120] G. Pröll, G. Markovic, L. Steinle, G. Gauglitz, *Meth. Mol. Biol.* **2009**, 503, 167.
- [121] C. P. Price, D. J. Newman, *Principles and Practice of Immunoassay*, Vol. 1, 1. Auflage ed., **1991**.
- [122] T. Kawaguchi, T. Shiro, K. Iwata, *Sens. Actuator B-Chem.* **1991**, 3, 113.
- [123] A. Brecht, G. Gauglitz, *Fresenius J. Anal. Chem.* **1994**, 349, 360.
- [124] K. B. Blodgett, I. Langmuir, *Phys. Rev.* **1937**, 51, 964.
- [125] I. Langmuir, V. J. Schaefer, D. M. Wrinch, *Science* **1937**, 85, 76.
- [126] G. Gauglitz, *Rev. Sci. Instrum.* **2005**, 76, 10.
- [127] A. Brecht, G. Lang, G. Gauglitz, *Fresenius J. Anal. Chem.* **1993**, 346, 615.
- [128] A. Brecht, G. Gauglitz, *Biosens. Bioelectron.* **1995**, 10, 923.
- [129] A. Brecht, J. Piehler, G. Lang, G. Gauglitz, *Anal. Chim. Acta* **1995**, 311, 289.
- [130] G. Gauglitz, J. Ingenhoff, *Fresenius J. Anal. Chem.* **1994**, 349, 355.
- [131] G. Kraus, G. Gauglitz, *Fresenius J. Anal. Chem.* **1994**, 349, 399.
- [132] F. Rathgeb, G. Gauglitz, *Anal. Chim. Acta* **1998**, 372, 333.
- [133] B. Möhrle, K. Kohler, J. Jaehrling, R. Brock, G. Gauglitz, *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, 384, 407.
- [134] F. Gesellchen, B. Zimmermann, F. W. Herberg, *Methods Mol. Biol.* **2005**, 305, 17.
- [135] A. Brecht, G. Gauglitz, C. Striebel, *Fresenius J. Anal. Chem.* **1992**, 343, 98.
- [136] A. Brecht, G. Gauglitz, *Sens. Actuators. B-Chem.* **1997**, 38-39, 1.
- [137] C. Hamai, T. L. Yang, S. Kataoka, P. S. Cremer, S. M. Musser, *Biophys. J.* **2006**, 90, 1241.
- [138] E. Reimhult, F. Höök, B. Kasemo, *Langmuir* **2003**, 19, 1681.
- [139] C. A. Keller, K. Glasmästar, V. P. Zhdanov, B. Kasemo, *Phys. Rev. Lett.* **2000**, 84, 5443.
- [140] S. W. Lee, Y. J. Na, S. D. Lee, *Langmuir* **2009**, 25, 5421.
- [141] E. Reimhult, F. Höök, B. Kasemo, *J. Chem. Phys.* **2002**, 117, 7401.
- [142] Y. T. Yang, J. D. Liao, Y. L. Lee, C. W. Chang, H. J. Tsai, *Nanotechnology* **2009**, 20, 7.
- [143] H. Schönherr, J. M. Johnson, P. Lenz, C. W. Frank, S. G. Boxer, *Langmuir* **2004**, 20, 11600.
- [144] P. S. Cremer, T. L. Yang, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 8130.
- [145] P. Nollert, H. Kiefer, F. Jähnig, *Biophys. J.* **1995**, 69, 1447.
- [146] G. Brink, L. Schmitt, R. Tampé, E. Sackmann, *Biochim. Biophys. Acta. - Biomembr.* **1994**, 1196, 227.
- [147] J. J. Ramsden, G. I. Bachmanova, A. I. Archakov, *Biosens. Bioelectron.* **1996**, 11, 523.
- [148] P. Mueller, D. O. Rudin, H. T. Tien, W. C. Wescott, *Nature* **1962**, 194, 979.
- [149] V. Tschärner von, H. M. McConnell, *Biophysical Journal* **1981**, 36, 421.
- [150] L. K. Tamm, H. M. McConnell, *Biophys. J.* **1985**, 47, 105.
- [151] M. Seul, S. Subramaniam, H. M. McConnell, *J. Phys. Chem.* **1985**, 89, 3592.
- [152] M. Stelzle, G. Weissmüller, E. Sackmann, *J. Phys. Chem.* **1993**, 97, 2974.
- [153] E. Kalb, S. Frey, L. K. Tamm, *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, 1103, 307.
- [154] V. Tschärner von, H. M. McConnell, *Biophysical Journal* **1981**, 36, 409.
- [155] A. A. Brian, H. M. McConnell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA-Biol. Sci.* **1984**, 81, 6159.
- [156] T. H. Watts, H. E. Gaub, H. M. McConnell, *Nature* **1986**, 320, 179.
- [157] R. C. Macdonald, R. I. Macdonald, B. P. M. Menco, K. Takeshita, N. K. Subbarao, L. R. Hu, *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, 1061, 297.

- [158] Y. Barenholz, D. Gibbes, B. J. Litman, J. Goll, T. E. Thompson, F. D. Carlson, *Biochem.* **1977**, *16*, 2806.
- [159] U. Seifert, *Adv. Phys.* **1997**, *46*, 13.
- [160] P. S. Cremer, S. G. Boxer, *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 2554.
- [161] E. Sackmann, *Science* **1996**, *271*, 43.
- [162] T. M. Bayerl, M. Bloom, *Biophys. J.* **1990**, *58*, 357.
- [163] T. Grawe, G. Schäfer, T. Schrader, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 1641.
- [164] M. Fokkens, T. Schrader, F. G. Klarner, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 14415.
- [165] S. Neidle, *Principles of Nucleic Acid Structure, Vol. 1*, Elsevier, London, UK, **2008**.
- [166] N. M. Luscombe, R. A. Laskowski, J. M. Thornton, *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 2860.
- [167] R. Rohs, S. M. West, A. Sosinsky, P. Liu, R. S. Mann, B. Honig, *Nature* **2009**, *461*, 1248.
- [168] O. Vázquez, J. B. Blanco-Canosa, M. E. Vázquez, J. Martínez-Costas, L. Castedo, J. L. Mascarenas, *Chembiochem* **2008**, *9*, 2822.
- [169] S. Futaki, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2005**, *57*, 547.
- [170] T. Schrader, *Chem. Eur. J.* **1997**, *3*, 1537.
- [171] T. Schrader, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, *35*, 2649.
- [172] S. K. Maji, R. Banerjee, D. Velmurugan, A. Razak, H. K. Fun, A. Banerjee, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 633.
- [173] P. Tundo, *Tetrahedron Lett.* **1978**, 4693.
- [174] M. Meyer, L. Fremond, A. Tabard, E. Espinosa, G. Y. Vollmer, R. Guillard, Y. Dory, *New J. Chem.* **2005**, *29*, 99.
- [175] M. Meyer, L. Fremond, E. Espinosa, S. Brandes, G. Y. Vollmer, R. Guillard, *New J. Chem.* **2005**, *29*, 1121.
- [176] J. Kotek, P. Vojtisek, I. Cisarova, P. Hermann, P. Jurecka, J. Rohovec, I. Lukes, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **2000**, *65*, 1289.
- [177] T. W. Green, P. G. M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3. Ed. ed., J. Wiley & Sons, New York, **1999**.
- [178] F. G. Klärner, U. Burkert, M. Kamieth, R. Boese, J. Benet-Buchholz, *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 1700.
- [179] PROVE-Software, <http://nihserver.mbi.ucla.edu/SAVS/>, **2009**.
- [180] PDB, *RCSB Protein Data Bank*, <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>, **2009**.
- [181] J. Pontius, J. Richelle, S. J. Wodak, *J. Mol. Biol.* **1996**, *264*, 121.
- [182] PyMOL, DeLano Scientific, **2005**.
- [183] T. Maruyama, S. Katoh, M. Nakajima, H. Nabetani, *Biotechnol. Bioeng.* **2001**, *75*, 233.
- [184] B. X. Huang, H. Y. Kim, C. Dass, *J. Am. Soc. Mass Spec.* **2004**, *15*, 1237.
- [185] T. F. Kumosinski, E. M. Brown, H. M. Farrell, *J. Dairy Sci.* **1993**, *76*, 2507.
- [186] C. Larroy, M. R. Fernández, E. González, X. Parés, J. A. Biosca, *Biochem. J.* **2002**, *361*, 163.
- [187] E. M. Alvarez, P. H. Risso, C. A. Gatti, M. Burgos, V. S. Sala, *Colloid and Polymer Science* **2007**, *285*, 507.
- [188] K. J. Cross, N. L. Huq, J. E. Palamara, J. W. Perich, E. C. Reynolds, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 15362.
- [189] C. R. W. Guimaraes, M. Cardozo, *J. Chem. Inf. Model.* **2008**, *48*, 958.
- [190] P. Kollman, *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 2395.
- [191] W. L. Jorgensen, *Acc. Chem. Res.* **1989**, *22*, 184.
- [192] T. Simonson, G. Archontis, M. Karplus, *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 430.

- [193] MacroModel, in *Version 9.0*, Schrödinger, LLC, Portland, **2005**.
- [194] D. Tabor, *J. Colloid Interface Sci.* **1980**, 75, 240.
- [195] A. Pockels, *Nature* **1893**, 48, 152.
- [196] A. Pockels, *Nature* **1891**, 43, 437.
- [197] A. Pockels, *Nature* **1892**, 46, 418.
- [198] A. Pockels, *Nature* **1894**, 50, 223.
- [199] L. Rayleigh, *Phil. Mag.* **1899**, 48, 321.
- [200] H. Devaux, *Smithonian Institute Ann. Rep.* **1913**, 261.
- [201] W. B. Hardy, *Proc. R. Soc. A* **1912**, 86, 610.
- [202] I. Langmuir, *J. Am. Chem. Soc.* **1917**, 39, 1848.
- [203] A. Ulman, Academic Press, San Diego, USA, **1991**.
- [204] K. Ariga, T. Kunitake, *Acc. Chem. Res.* **1998**, 31, 371.
- [205] P. Shahgaldian, A. W. Coleman, *Langmuir* **2001**, 17, 6851.
- [206] M. Sakurai, H. Tamagawa, Y. Inoue, K. Ariga, T. Kunitake, *J. Phys. Chem. B* **1997**, 101, 4810.
- [207] L. Wilhelmly, *Ann. Physik und Chemie* **1863**, 195, 177.
- [208] S. T. Milner, J. F. Joanny, P. Pincus, *Europhys. Lett.* **1989**, 9, 495.
- [209] W. D. Harkins, L. E. Coplland, *J. Chem. Phys.* **1942**, 10, 272.
- [210] D. Andelman, F. Brochard, J. F. Joanny, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, 84, 4717.
- [211] R. Zadmard, M. Arendt, T. Schrader, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 7752.
- [212] R. Zadmard, T. Schrader, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 904.
- [213] Systat-Software, SigmaPlot für Windows 10.0, **2006**.
- [214] C. S. Wilcox, in *Frontiers in Supramolecular Organic Chemistry and Photochemistry*, VCH, Weinheim, **1991**.
- [215] H. J. Schneider, R. Kramer, S. Simova, U. Schneider, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 6442.
- [216] P. Job, *Compt. Rend.* **1925**, 180, 1108.
- [217] M. Rytömaa, P. K. J. Kinnunen, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 3197.
- [218] P. W. Schiller, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1972**, 69, 975.
- [219] V. Mahalingam, S. Onclin, M. Peter, B. J. Ravoo, J. Huskens, D. N. Reinhoudt, *Langmuir* **2004**, 20, 11756.
- [220] M. J. W. Ludden, A. Mulder, T. R., D. N. Reinhoudt, J. Huskens, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 4104.
- [221] N. Horan, L. Yan, H. Isobe, G. M. Whitesides, D. Kahne, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 11782.
- [222] G. Scatchard, *Ann. NY Acad. Sci.* **1949**, 51, 660.
- [223] C. Di Primo, *J. Mol. Rec.* **2008**, 21, 37.
- [224] BIAevaluation, 3.1 ed., Biacore, Uppsala, Schweden, **1999**.
- [225] M. J. Eddowes, *Biosensors* **1987**, 3, 1.
- [226] M. Gavutis, E. Jaks, P. Lamken, J. Piehler, *Biophys. J.* **2006**, 90, 3345.
- [227] Sigma Aldrich, [http://sigma-aldrich.custhelp.com/app/answers/detail/a\\_id/2756/p/42,889](http://sigma-aldrich.custhelp.com/app/answers/detail/a_id/2756/p/42,889), **2010**.
- [228] G. M. Blackburn, M. J. Gait, D. Loakes, D. M. Williams, in *Nucleic Acids in Chemistry and Biology, Vol. 3*, RCS Publishing, Cambridge, **2006**.
- [229] R. K. Rose, *Caries Res.* **2000**, 34, 427.
- [230] J. E. Gestwicki, H. V. Hsieh, J. B. Pitner, *Anal. Chem.* **2001**, 73, 5732.
- [231] M. Nigen, V. Le Tilly, T. Croguennec, D. Drouin-Kucma, S. Bouhallab, *Biochim. Biophys. Acta-Proteins and Proteomics* **2009**, 1794, 709.
- [232] M. Nigen, T. Croguennec, D. Renard, S. Bouhallab, *Biochemistry* **2007**, 46, 1248.

- [233] M. Nigen, T. Croguennec, M. N. Madec, S. Bouhallab, *Febs Journal* **2007**, 274, 6085.
- [234] F. Ding, G. Y. Zhao, J. L. Huang, Y. Sun, L. Zhang, *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, 44, 4083.
- [235] S. Hutschenreiter, L. Neumann, U. Rädler, L. Schmitt, R. Tampé, *ChemBioChem* **2003**, 4, 1340.
- [236] *Organikum, Vol. 21., neu bearbeitete und erweiterte Auflage*, Wiley-VCH, **2001**.
- [237] D. D. Perrin, W. L. F. Armarengo, *Purification of Laboratory Chemicals*, Pergamon Press, New York, **1988**.
- [238] B. M. Nakhle, S. A. Trammell, K. M. Sigel, T. J. Meyer, B. W. Erickson, *Tetrahedron* **1999**, 55, 2835.
- [239] F. G. Klärner, J. Polkowska, J. Panitzky, U. P. Seelbach, U. Burkert, M. Kamieth, M. Baumann, A. E. Wigger, R. Boese, D. Bläser, *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 1405.
- [240] S. Isomura, P. Wirsching, K. D. Janda, *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 4115.
- [241] D. Muller, I. Zeltser, G. Bitan, C. Gilon, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 411.
- [242] M. Tamura, Y. Urano, K. Kikuchi, T. Higuchi, M. Hirobe, T. Nagano, *J. Organomet. Chem.* **2000**, 611, 586.





**LEBENS LAUF**

<b>Name</b>	Marc Blecking
<b>Geburtsdatum</b>	03. März 1978
<b>Geburtsort</b>	Dinslaken
<b>Staatsangehörigkeit</b>	deutsch
<b>Familienstand</b>	verheiratet
08/1984 - 06/1988	Pestalozzi-Grundschule in Voerde/Niederrhein
08/1988 - 03/1992	Theodor-Heuss-Gymnasium in Dinslaken
03/1992 - 06/1997	Gymnasium Voerde/Niederrhein, Erwerb der allgemeinen Hochschulreife
09/1997 - 07/2000	Berufsausbildung an der Universität-GH Essen zum Chemielaboranten
08/2000 - 07/2001	Zivildienst an der Erich-Kästner-Schule, Sonderschule für Sprach- und Hörbehinderte des Kreises Wesel in Wesel
10/2001	Immatrikulation an der Universität zu Köln im Studiengang Chemie DII zum WS 2001/2002
04/2002 - 09/2006	Fortsetzung des Chemiestudiums DII an der Universität Duisburg-Essen zum SS 2002, Hauptstudium: Medizinisch-Biologische Chemie
09/2003	Abschluss der Diplomvorprüfungen
02/2005 - 05/2005	Vertiefungspraktikum an der University of Maryland, (College Park, Maryland, USA) im AK von Prof. Dr. L. Isaacs mit dem Thema „Synthesis of a Glycoluril-Naphthalene-Clip and Studying of its Molecular Recognition Properties with <sup>1</sup> H-NMR-Titrations.“
01/2006	Abschluss der Diplomhauptprüfungen
02/2006 – 09/2006	Anfertigung der Diplomarbeit „Synthese der diphosphonat-tetramethoxysubstituierten Naphthalinpinzette. Verhindern die terminalen Methoxysubstituenten die Selbstorganisation der Pinzette in Wasser?“ am Institut für Organische Chemie der Universität Duisburg-Essen unter Anleitung von Prof. Dr. F.-G. Klärner
01/2008 – 12/2008	Stipendium der WASAG-Stiftung für Studiensförderung
10/2006 – 03/2010	Anfertigung der Dissertation „Rezeptorlipide zur Assemblierung von basischen und Arginin-getaggtten Proteinen auf Oberflächen“ am Institut für Organische Chemie der Universität Duisburg-Essen unter Anleitung von Prof. Dr. T. Schrader
	Anstellung als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Organische Chemie der Universität Duisburg-Essen